



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA III



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314054868

618263872
125042233

**ANALISIS DE LOS INDUCTORES VIRALES DE LA
RESISTENCIA FRENTE A TOBAMOVIRUS EN EL
GENERO *Capsicum***

TESIS DOCTORAL

PATRICIA GILARDI NAVARRO

Madrid, 2000

24410



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA III

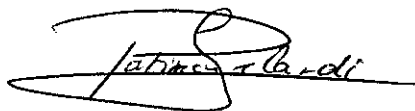
**ANALISIS DE LOS INDUCTORES VIRALES DE LA
RESISTENCIA FRENTE A TOBAMOVIRUS EN EL
GENERO *Capsicum***

Memoria presentada para optar al
grado de Doctor en Ciencias Biológicas por
PATRICIA GILARDI NAVARRO

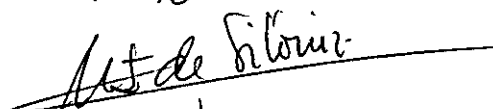
Vº Bº Director de la Tesis:

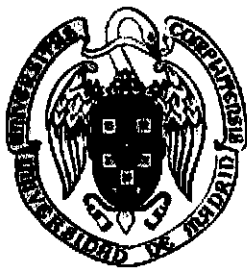


Dra. Mª Teresa Serra Yoldi
Científico Titular
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Patricia Gilardi Navarro

Vº Bº

P.D. Tutor,



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL**



**CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE PLANTAS**

ANÁLISIS DE LOS INDUCTORES VIRALES DE LA RESISTENCIA FRENTE A TOBAMOVIRUS EN EL GENERO *Capsicum*

TESIS DOCTORAL

**PATRICIA GILARDI NAVARRO
Madrid, 2000**

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo la dirección de la Dra. M^a Teresa Serra Yoldi con la financiación de una beca de Formación de Personal Investigador de la Comunidad Autónoma de Madrid.

RESUMEN

Las virosis constituyen un grave problema en los cultivos de pimiento en invernadero en nuestro país. Entre los virus que tienen una mayor importancia como agentes causales de enfermedades se encuentran las cepas pimiento de los tobamovirus. La resistencia frente a tobamovirus en el género *Capsicum* está conferida por cuatro genes diferentes L^1 , L^2 , L^3 y L^4 , considerados alelos del locus L (Boukema, 1980, 1982). Esta resistencia denominada de tipo hipersensible (HR) se caracteriza por ser un proceso de defensa activo frente a la infección viral, localizando el virus en los sitios de infección o en células adyacentes, y por la producción de lesiones locales necróticas. La resistencia mediada por HR es la consecuencia de la interacción entre genes presentes en el hospedador (genes de resistencia o R) y en el patógeno (genes de avirulencia o avr). Estos inductores son codificados directa o indirectamente por los genes de avirulencia. El reconocimiento de estos inductores activa una cascada de genes de defensa del hospedador que lleva a una HR y a una inhibición del desarrollo del patógeno.

En el trabajo que se ha desarrollado hemos identificado que los factores virales de los tobamovirus, el virus del mosaico suave de la páprika (PaMMV), la cepa española del virus del mosaico suave del pimiento (PMMoV-S) y la cepa italiana del mismo virus (PMMoV-I), inductores de la resistencia en plantas de *C. frutescens* (L^2L^2), *C. chinense* (L^3L^3) y *C. chacoense* (L^4L^4) son las proteínas de cubierta de los virus. Mediante la expresión de las CPs en el vector derivado del virus X de la patata (pPC2S) hemos determinado el alto grado de especificidad que existe en la interacción con los genes L mediante el estudio de la sintomatología desarrollada en las plantas inoculadas y de la inducción de la expresión de proteínas asociadas a la defensa vegetal, siempre comparándolas con el desarrollo de las infecciones en plantas inoculadas con los tobamovirus completos. Se ha determinado que aquellos virus qumera (PVX-CP de tobamovirus) una vez que se inducía la resistencia eran incapaces de moverse e infectar hojas diferentes a las inoculadas. Así mismo se ha estudiado mediante la clonación de las CPs en un vector de expresión transitoria la inducción de la muerte celular y de la expresión de genes asociados a la respuesta de resistencia cuando las CPs se expresaban en los huéspedes adecuados (CP de PaMMV en *C. frutescens*, CP de PMMoV-S en *C. chinense* y CP de PMMoV-I en *C.*

chacoense), determinándose que eran los únicos factores virales necesarios para la inducción de la HR en plantas del género *Capsicum* con los correspondientes genes L.

El sistema PMMoV-C. *chinense* nos ha permitido caracterizar la respuesta de defensa estas plantas, puesto que la cepa española de PMMoV induce la resistencia en este huésped y la cepa italiana la sobrepasa, y se trata de dos virus que tienen un alto grado de homología en su secuencia. En el trabajo realizado hemos seguido el ciclo de infección de ambos virus determinando si en la reacción de defensa está afectada la acumulación de la proteína de cubierta viral o el ARN. Asociadas a la reacción de defensa hay una serie de mecanismos como son la acumulación de especies reactivas de oxígeno, la fortificación de la pared celular, la acumulación de mARNs de genes asociados a la resistencia y la muerte celular, que se ha demostrado que se inducen claramente cuando las plantas de *C. chinense* son inoculadas con la cepa inductora de la resistencia y no cuando son inoculadas con la cepa que la sobrepasa.

En plantas en las que ya se ha establecido una primera reacción de defensa asociada a la HR frecuentemente se induce una resistencia adicional frente a posteriores ataques por otros patógenos. En este trabajo se ha establecido que la inoculación en plantas de *C. chinense* de PMMoV-S induce una reacción de defensa capaz de frenar la infección por una inoculación posterior de un virus perteneciente a otro grupo como el virus X de la patata (PVX).

ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μl	Microlitro
ac.	ácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
AP	fosfatasa alcalina
ARN	ácido ribonucleico
BSA	albúmina de suero bovino
CP	proteína de la cápsida viral
dNTP	5'dexosinucleósido trifosfato
d.p.i.	días pos inoculación
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
ELISA	ensayo inmunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
g	gramo
h	hora
HR	respuesta hipersensible
IgG	inmunoglobulina tipo G
kDa	kilodalton
MES	morfolin-et-al-sulfónico
Mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
°C	grado centígrado
OD	densidad óptica
p/v	peso/volumen
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
r.p.m.	revoluciones por minuto
RT	transcripción reversa
SDS	dodecilsulfato sódico
seg	segundo

RESUMEN

ABREVIATURAS

I. INTRODUCCION	1
I.1 TOBAMOVIRUS EN PIMIENTO	2
I.1.1. Características biológicas	2
I.1.2. Características morfológicas y organización genómica	4
I. 2. RESISTENCIA A TOBAMOVIRUS EN EL GENERO <i>Capsicum</i>	5
I.3. RESISTENCIA NATURAL EN PLANTAS	7
I.4. GENES <i>Avr</i> DE TOBAMOVIRUS E INDUCTORES DE LA RESISTENCIA EN PLANTAS	9
I.4.1. La replicasa viral como inductor de la resistencia	10
I.4.2. La proteína de movimiento como inductor de la resistencia	10
I.4.3. La proteína de cubierta como inductor de la resistencia	11
I.5.EXPRESIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA	12
I.5.1.Especies reactivas de oxígeno (ROS)	13
I.5.2.Fortificación de la pared celular	14
I.5.3. Formación de moléculas señal	15
I.5.4.Inducción de genes de resistencia	17
I.5.5.Muerte celular	19
I.6. RESISTENCIA INDUCIDA	20
I.6.1.Protección cruzada	20
I.6.2.Resistencia adquirida	21
I.7. OBJETIVOS	22
II.MATERIALES Y METODOS	23
II.1.MATERIALES	24
II.1.1.Virus	24
II.1.2.Plantas de ensayo	24
II.1.3.Bacterias	24
II.1.4.Cebadores	24
II.1.5.Vectores	25
II.1.6.Inmunosueros	25
II.1.7.Tampones y soluciones generales	26
II.2.METODOS	26
II.2.1.Cultivo de plantas en tierra	26
II.2.2.Inoculación de virus en plantas de los géneros <i>Nicotiana</i>	

y <i>Capsicum</i>	26
II.2.3.Cultivo de plantas <i>in vitro</i>	27
II.2.4.Purificación de virus	27
II.2.5.Obtención de células competentes y transformación	27
II.2.6.Purificación de ADN plasmídico	28
II.2.7.Electroforesis en geles de agarosa	28
II.2.8.Elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa	28
II.2.9.Construcción de genomas virales híbridos	29
II.2.9.1.Clonaje de la CP de PaMMV	29
II.2.9.2.Clonaje de la CP de PMMoV-S	30
II.2.9.3.Clonaje de la CP de PMMoV-I	31
II.2.9.4.Clonaje del gen GUS en el vector pMJD82	32
II.2.10.Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias	32
II.2.11.Generación de transcritos virales	32
II.2.12.Propagación de virus quimeras en plantas	33
II.2.13.Detección de las proteínas de cubierta virales mediante ELISA-DAS	33
II.2.14.Detección de las proteínas de cubierta virales mediante Western Blot	34
II.2.15.Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa o de PVDF	34
II.2.16.Inmunodetección de proteínas sobre filtros	34
II.2.17.Preparación de ARN total de la planta	35
II.2.18.Detección por RT-PCR de las secuencias de las proteínas de cubierta de los tobamovirus	35
II.2.19.Extracción y cuantificación de proteínas para el análisis de PRs en plantas del género <i>Capsicum</i>	36
II.2.20.Detección de proteínas PR1 en plantas del género <i>Capsicum</i>	37
II.2.21.Transfección de plantas del género <i>Capsicum</i> por el método biolístico	37
II.2.22.Análisis de la actividad β -glucuronidasa	38
II.2.23.Análisis de ARN por el método "Northern"	39
II.2.24.Marcaje de ácidos nucleicos	40
II.2.25.Detección de especies reactivas de oxígeno	40
II.2.26.Detección de callosa	41
II.2.27.Detección de autofluorescencia en zonas necrosadas	41

II.2.28.Cuantificación de la muerte celular	42
II.2.29.Análisis de ARN diferenciales por RT-PCR	42
III.RESULTADOS	44
III.1. ESTUDIO DE LOS INDUCTORES VIRALES DE LA RESISTENCIA CONFERIDA POR LOS GENES L EN EL GÉNERO <i>Capsicum</i>	45
III.1.1.Clonaje de las proteínas de cubierta de los virus PaMMV, PMMoV-S y PMMoV-I en el vector pPC2S	45
III.1.2.Infectividad y acumulación de los virus quimera en plantas del género <i>Nicotiana</i>	45
III.1.3.Estudio de los inductores virales de la resistencia en plantas de <i>C. frutescens</i> (L ² L ²)	50
III.1.3.1.Inducción de marcadores de resistencia por la proteína de cubierta de PaMMV	56
III.1.3.2.Estudio de la inducción de la muerte celular y genes asociados a la resistencia en plantas de <i>C.frutescens</i>	58
III.1.4.Estudio de los inductores virales de la resistencia en plantas de <i>C. chinense</i> (L ³ L ³)	64
III.1.4.1.Inducción de marcadores de resistencia por la proteína de cubierta de PMMoV-S	65
III.1.4.2.Estudio de la inducción de la muerte celular y genes asociados a la resistencia en plantas de <i>C.chinense</i>	70
III.1.5.Estudio de los inductores virales de la resistencia en plantas de <i>C. chacoense</i> (L ⁴ L ⁴)	75
III.1.5.1.Inducción de marcadores de resistencia por la proteína de cubierta de PMMoV-I	77
III.1.5.2.Estudio de la inducción de la muerte celular y genes asociados a la resistencia en plantas de <i>C.chacoense</i>	77
III.2.Estudio de la resistencia frente a PMMoV en plantas de <i>Capsicum chinense</i>	85
III.2.1.Estudio del ciclo de replicación viral de PMMoV	85
III.2.2.Análisis de factores asociados a la respuesta de defensa	87
III.2.2.1.Producción de especies reactivas de oxígeno	89

III.2.2.1.1. Producción de O_2^-	89
III.2.2.2. Producción de H_2O_2	90
III.2.2.2. Estudio de la fortificación de la pared celular	91
III.2.2.3. Estudio de la inducción de la muerte celular	92
III.2.2.4. Análisis de los cambios en los ARNs mensajeros inducidos en plantas de <i>C. chinense</i> en respuesta a la infección por las cepas española e italiana de PMMoV	96
III.2.3. Inducción de resistencia adquirida en <i>C. chinense</i>	99
IV. DISCUSION	110
V. CONCLUSIONES	132
VI. BIBLIOGRAFIA	135

INTRODUCCION

I. TOBAMOVIRUS EN PIMIENTO

Las virosis constituyen un problema que afecta a los cultivos de pimiento en todas las áreas donde se cultiva. Se conocen alrededor de 30 virus que son capaces de infectar estas plantas. En nuestro país entre los virus que más afectan a los cultivos de invernadero se encuentran algunos tobamovirus como el virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) y el virus del mosaico del tomate (ToMV) (García-Luque *et al.*, 1990; Luis Arteaga y Gil Ortega, 1992). Los tobamovirus son un grupo de virus vegetales cuyo miembro tipo es el virus del mosaico del tabaco (TMV) y son considerados como uno de los agentes etiológicos que causan mayores pérdidas en cultivos de pimiento en todo el mundo.

Aunque TMV y el virus del mosaico del tomate (ToMV) afectan de forma importante a estos cultivos, durante los últimos 20 años se ha prestado una particular atención a tobamovirus capaces de infectar plantas de pimiento con resistencia incorporada a TMV y a ToMV, las llamadas cepas de pimiento de los tobamovirus. Desde la primera cita de estos tobamovirus por McKinney en 1952 en U.S.A. se han descrito en todo el mundo y bajo diferentes nombres, aunque el más frecuentemente utilizado es el de cepas pimiento de los tobamovirus o TMV de pimiento. En 1984, Wetter y colaboradores llevaron a cabo la caracterización de uno de estos tobamovirus que devastó los cultivos de pimiento de Sicilia. El análisis biológico y fisicoquímico del aislado llevaron a los autores a proponer que este virus debería ser considerado como un nuevo miembro de los tobamovirus bajo el nombre del virus del moteado suave del pimiento (pepper mild mottle virus, PMMoV). (Wetter *et al.*, 1984; Wetter y Conti, 1988).

I.1.1. Características biológicas

En plantas de especies susceptibles del género *Capsicum* los síntomas pueden ir desde un moteado muy suave hasta un mosaico severo y/o amarilleamiento. En plantas resistentes, los síntomas son normalmente lesiones locales necróticas aunque también se han descrito necrosis apicales, necrosis en venas y necrosis sistémica dependiendo de las condiciones de crecimiento y del bagaje genético de las plantas (Boukema *et al.*, 1983; Kostova *et al.*, 1983). En general los síntomas no son fácilmente discernibles en la parte vegetativa de la planta, mientras que en los frutos son más acusados, mostrando un tamaño reducido, malformaciones y necrosis. El porcentaje de plantas infectadas es muy alto, normalmente cercano al 100%.

Los análisis biológicos iniciales llevados a cabo con estas cepas pimiento mostraron que todas ellas, además de infectar cultivos de pimiento resistentes a TMV y ToMV, tienen algunas propiedades biológicas en común. Así, muchos de ellos son incapaces de infectar plantas de tomate (Stoimenova, 1983; Tobias *et al.*, 1982) por lo que este huésped es considerado como un hospedador inmune para las cepas pimiento de los tobamovirus.

Además, estos tobamovirus presentan una patogenicidad más reducida en otras especies de la familia Solanáceas. Así inducen pequeñas lesiones locales necróticas, a diferencia de las inducidas por TMV o ToMV, en especies de *Nicotiana* como *N. tabacum* Xanthi nc, *N. glutinosa* L. o *N. sylvestris* Speg. & Comes, excepto en el caso del aislado de campo P101 que se ha descrito que es incapaz de infectar este último huésped (Stoimenova, 1983), y la cepa Ob de TMV que es el único tobamovirus capaz de sobrepasar la resistencia conferida por el gen N de *Nicotiana* (Tobias *et al.*, 1982). En tabaco *Xanthi* nc, la infección por el aislado P101 y por el virus del moteado suave de la páprika (PaMMV) inducen la formación de lesiones locales blancas mientras que las inducidas por el resto de las cepas pimiento son necróticas. A diferencia de la mayoría de los tobamovirus, ninguna de las cepas pimiento es capaz de infectar sistémicamente tabaco cv Samsum, aunque pueden establecer una infección local en las hojas inoculadas (McKinney, 1952; Tobias *et al.*, 1982).

No se ha detectado ningún vector que transmita ninguna de las cepas pimiento de los tobamovirus. Estos virus son transmitidos a través de semillas y por contacto mecánico en las prácticas agrícolas. Se acepta de forma general que el uso de semillas contaminadas es responsable de brotes severos de la enfermedad en todo el mundo (McKinney, 1952; Greenleaf *et al.*, 1964; Rast, 1979; Avgelis, 1986). Mientras que ToMV queda en la superficie del core de la semilla, las cepas pimiento se encuentran en el interior de las semillas sin que el tratamiento con agentes esterilizantes como Na_3PO_4 , puedan eliminar de forma total el virus, aunque sí disminuir las infecciones virales a partir de semillas contaminadas (Rast, 1983; Avgelis, 1986). La imposibilidad de eliminar el virus de forma completa representa un riesgo severo para la agricultura, puesto que teniendo en cuenta que los tobamovirus son transmitidos de forma mecánica durante las prácticas agrícolas las semillas contaminadas pueden convertirse en una fuente viral desde la cual se disemine por todo el cultivo.

I.2.2. Características morfológicas y organización genómica

Los virus del grupo de los tobamovirus se caracterizan por tener una cápsida rígida y alargada de aproximadamente 18 nm de diámetro y una longitud de 300 nm. Los capsómeros que la constituyen se componen de una única cadena polipeptídica de entre 17 y 18 kDa y se distribuyen helicoidalmente alrededor de una molécula de ARN lineal de polaridad positiva que constituye el genoma del virus y que contiene 4 fases de lectura abiertas (ORF) que codifican para cuatro polipéptidos. En el extremo 5' hay una estructura metilada o "cap" (m7GpppG...) y secuencias no codificantes.

La primera ORF codifica una proteína de 126 kDa (126K) que se traduce del ARN genómico. La segunda ORF se traduce también del ARN genómico por lectura a través del codón de terminación ambar de la proteína 126K dando lugar a una proteína de 183kDa (183K). La proteína 126K tiene motivos de secuencia de metiltransferasas y de helicasas. En la parte no común de la 183K con la 126K se encuentran motivos de ARN polimerasas. Ambas proteínas forman parte del complejo replicativo viral y se encuentran también implicadas en la dispersión del virus a larga distancia (Ishikawa *et al.*, 1986; Young y Zaitlin, 1986; Young *et al.*, 1987; Goldbach y Wellink, 1988; Strauss y Strauss, 1988; Quadt y Jaspars, 1989; Ogawa *et al.*, 1991).

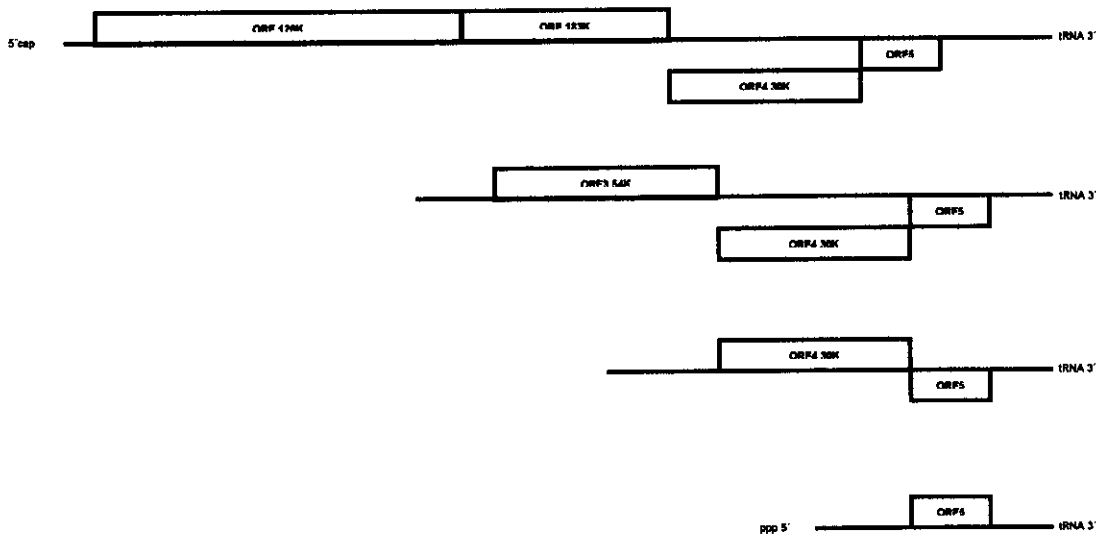


Figura 1. Organización genómica y estrategia de replicación de PMMoV-S, se muestra la molécula de ARN genómica de polaridad positiva y los mARN subgenómicos a partir de los cuales se sintetizan las proteínas de las ORF que se encuentran próximas al extremo 5' del mARN, representadas situadas por encima de la línea que representa el ARN.

La tercera ORF codifica una proteína de 30kDa (30K) que se traduce a partir de un mensajero subgenómico 3'coterminal con el ARN genómico (Beachy y Zaitlin, 1975), este mRNA carece de estructura cap en su extremo 5'. Esta ORF genera la proteína de movimiento (MP) necesaria para el movimiento célula a célula del virus (Deom *et al.*, 1987; Meshi *et al.*, 1988). La MP se localiza en las paredes celulares y modifica el tamaño del poro (límite de exclusión) de los plasmodesmos (Wolf *et al.*, 1989). Tiene un dominio de unión a ácidos nucleicos monocatenarios, lo que se ha interpretado como un papel de modificar la estructura del ARN del virus, haciendo que tenga un menor volumen y pueda pasar por los plasmodesmos modificados (Citovsky *et al.*, 1992).

La cuarta ORF codifica para una proteína de 17.5 kDa que es la proteína de la cápsida del virus (CP). Esta proteína es también traducida a través de un mensajero subgenómico (Hunter *et al.*, 1976). Esta proteína cumple una función estructural como proteína de cubierta del virus y es necesaria para el movimiento sistémico del mismo (Holt y Beachy, 1991). Además determina la gama de huéspedes del virus (Hilf y Dowson, 1993) y es el inductor viral de la resistencia de determinados genes de resistencia presentes en las plantas infectadas (Knorr y Dawson, 1988; Saito *et al.*, 1987; Gilardi *et al.*, 1998).

I. 2. RESISTENCIA A TOBAMOVIRUS EN EL GENERO *Capsicum*

En el género *Capsicum*, la resistencia frente a tobamovirus es conferida por cuatro genes alélicos en el locus *L* ($L^1 - L^4$) con un incremento en la efectividad frente a los miembros de los tobamovirus (Boukema *et al.* 1980, Boukema 1982.). Estos virus se han agrupado en patotipos, que se han designado como P_0 , P_1 , $P_{1,2}$, y $P_{1,2,3}$, según su capacidad para sobrepasar la resistencia de los genes L^1 , L^2 , L^3 y L^4 .

PLANTA	GENOTIPO	PATOTIPOS			
		P ₀	P ₁	P _{1,2}	P _{1,2,3}
C. annuum cv. Early Calwonder	L ⁺ L ⁺	MS	MS	MS	MS
C. annuum cv. Bruinsma Wonder	L ¹ L ¹	LLN	MS	MS	MS
C. frutescens c. Tabasco	L ² L ²	LLN	LLN	MS	MS
C. chinense PI159236	L ³ L ³	LLN	LLN	LLN	MS
C. chacoense SA/85	L ⁴ L ⁴	LLN	LLN	LLN	LLN

LLN – Lesiones Locales Necróticas. MS – Mosaico Sistémico

En distintas zonas de Europa se han aislado diferentes tobamovirus capaces de infectar plantas de pimiento como, el virus del mosaico del tabaco (TMV) y el virus del mosaico del tomate (ToMV) (Arteaga y Ortega, 1981; Selassie *et al.*, 1981; Paludan, 1982; Erkan y Yorganci, 1983; Avgelis, 1986). En 1989 Alonso *et al.* caracterizaron un aislado de un tobamovirus que era capaz de infectar plantas de pimiento con resistencia incorporada a TMV y ToMV, que producía síntomas de mosaico suave en hojas de plantas infectadas pero severas deformaciones y necrosis en los frutos. Uno de estos aislados (AL78/84) fue identificado como una estirpe del virus del moteado suave del pimiento y se caracterizó como un patotipo P_{1,2} (García Luque *et al.*, 1990). A este aislado se le denominó como la cepa española de PMMoV (PMMoV-S), que hay que diferenciar del la cepa italiana de PMMoV (PMMoV-I) que fue caracterizado como un patotipo P_{1,2,3} (Wetter *et al.*, 1984). Dentro del grupo de los tobamovirus también se engloba un aislado holandés denominado P₁₁ que se caracterizó como un patotipo P₁ (Rast, 1977). A este virus se le denominó virus del moteado suave de la páprika (PaMMoV) .

Una posterior determinación de la secuencia nucleotídica y el análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína de cubierta de dos diferentes aislados de PMMoV, el aislado español (S) y el italiano (I), estableció que ambos eran diferentes cepas del mismo virus (García-Luque *et al.*, 1993). La cepa española no es capaz de sobrepasar la resistencia conferida por el gen L³, al contrario que la cepa italiana (García-Luque *et al.*, 1991). Este estudio corroboró las caracterizaciones previas de estos tobamovirus basadas en el análisis biológico, serológico y en composición de aminoácidos de sus proteínas de cubierta y llevaron a concluir que

todos los tobamovirus anteriormente descritos como patotipos $P_{1,2}$ o $P_{1,2,3}$ son cepas de PMMoV, siendo la cepa italiana la cepa tipo (Wetter *et al.*, 1984; Wetter, 1984).

Como hemos indicado anteriormente la resistencia en *Capsicum* frente a tobamovirus está conferida por 4 genes alélicos del locus L. El gen L^2 de *C.frutescens* fue el primer gen de resistencia descrito en plantas (Holmes, 1934) como un factor dominante mendeliano que lleva a la localización de TMV en hojas inoculadas de pimientos *C.frutescens* L.. Los genes de resistencia L^1 y L^3 son parcialmente dominantes. De esta forma, la inducción de la resistencia da lugar no sólo a la formación de lesiones locales necróticas, sino que síntomas de necrosis en venas y necrosis apical pueden desarrollarse dependiendo del bagaje genético, las condiciones de crecimiento de las plantas (intensidad de luz y regímenes de temperatura), y las cepas virales (Boukema *et al.*, 1980; Boukema, 1982). La dominancia del gen L^4 es desconocida (Boukema, 1984).

Como muchos de los genes de resistencia, la resistencia mediada por los genes L no es expresada a nivel de una sola célula, necesita una organización multicelular para su expresión (Gilardi *et al.*, en prensa).

1.3. RESISTENCIA NATURAL EN PLANTAS

La resistencia en plantas puede expresarse de diferentes formas que pueden ser clasificadas en tres fenotipos, la inmunidad, la tolerancia y la restricción del virus.

Inmunidad: a esta resistencia también se le denomina resistencia de plantas no-huésped. El virus es incapaz de replicarse en las células de la planta infectada y esta resistencia se expresa en células individuales. Se considera pues que es una resistencia extrema. Pueden existir varios mecanismos que expliquen este tipo de resistencia, por ejemplo se ha propuesto que existan enzimas en las plantas que degraden bien las proteínas virales o bien el ácido nucleico viral, o que las plantas puedan carecer de algún factor esencial para que se produzca la replicación viral (Zaitlin y Hull, 1987).

Tolerancia: es una resistencia que se expresa como ausencia de síntomas sin inhibición de la multiplicación viral (Loi *et al.*, 1986; Edwards y McMullen, 1988) No hay ninguna hipótesis sobre el mecanismo que implica esta reacción. En algunos sistemas se postula que la reducción de la replicación viral hasta unos niveles por debajo de un

postula que la reducción de la replicación viral hasta unos niveles por debajo de un determinado umbral, es lo que determina que el daño debido a síntomas virales sea indetectable (Ponz y Bruening, 1988). Este es el caso de varias especies de cereales que presentan tolerancia al luteovirus del enanismo amarillo de la cebada (Skaria *et al.*, 1985).

Restricción: también es llamada resistencia específica de cultivar, puesto que, la mayoría de los miembros de una especie son susceptibles a la infección y únicamente algunos de ellos contienen genes que les confieren resistencia a un determinado virus. en las plantas que presentan este tipo de resistencia los virus son restringidos a las primeras células infectadas o a las células adyacentes, bloqueándose su diseminación por toda la planta. Se considera que esta resistencia es un proceso activo en el que existe una inducción de la respuesta de defensa en plantas frente al patógeno. Generalmente este fenotipo de resistencia no se expresa a un nivel de células individuales y los síntomas de las plantas van desde los no visibles hasta reacciones de necrosis.

En el género *Capsicum*, la resistencia frente a tobamovirus conferida por los genes L se encuadra en este último tipo de resistencia y se manifiesta por la inducción de lesiones locales necróticas (LLN) con la localización del virus en los sitios de infección primarios, lo que se ha dado en llamar reacción hipersensible (HR). La reacción hipersensible (HR) es la respuesta más común asociada con la resistencia activa (Klement, 1982; Goodman y Novacky, 1994). Se caracteriza por la localización del virus en los lugares primarios de infección acompañada de la aparición de necrosis. Este proceso de muerte celular presenta similitudes con los procesos de muerte celular programada (PCD) descritos en células animales (Dang *et al.*, 1996; Pennel y Lamb, 1997) y se postula que la HR podría también ser considerada como un proceso de PCD (Greenberger *et al.*, 1994; Greenberg, 1997).

Esta resistencia activa está controlada por uno o un reducido número de genes y responde al modelo de resistencia gen a gen propuesto por Flor (1971), según el cual a cada gen de resistencia del huésped R, le corresponde un gen de avirulencia en el microorganismo patógeno (Avr). La interacción específica entre los productos codificados por ambos genes determinará la activación de los mecanismos de defensa de la planta. Se postula que esta interacción responde a un modelo "ligando-receptor" (Keen, 1990; Gabriel y Rolfe, 1990). Este modelo propone que el reconocimiento específico de los componentes del patógeno, denominados inductores o factores de avirulencia, por los

correspondientes factores del huésped o receptores, activaría las vías de transducción de señal y la cascada de genes que determinan la expresión de la resistencia (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Scheel, 1998). El clonaje de algunos genes de resistencia (Hammond-Kosack y Jones, 1997) y también de genes de avirulencia (Hutcheson, 1998) ha permitido confirmar la validez de este modelo y al menos en un caso se ha podido confirmar la interacción directa y específica de los productos de los genes R y Avr (Scofield et al., 1996).

El primer gen de avirulencia clonado fue el de la raza 6 de *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* (Staskavicz et al., 1984). En el caso de los hongos el primer gen de avirulencia clonado fue el *avr9* de *Cladosporium fulvum* (De Wit et al., 1985; van Kan et al., 1991). El aislamiento del producto del gen, el péptido Avr9, permitió determinar que se trataba de un péptido de pequeño tamaño que sólo era funcional en plantas de tomate con el gen de resistencia Cf9.

La caracterización del primer gen de avirulencia de un virus fue realizada por Knorr y Dawson (1988). Estos autores observaron que determinados cambios aminoacídicos en la CP de TMV modificaban su fenotipo de avirulentas a virulentas cuando eran inoculadas en plantas de tabaco con el gen N'. Posteriormente se comprobó que la CP de TMV es inductor de la resistencia conferida por el gen N' en plantas de tabaco (Culver y Dawson, 1991).

I.4. GENES *Avr* DE TOBAMOVIRUS E INDUCTORES DE LA RESISTENCIA EN PLANTAS

En el caso de los tobamovirus se han identificado algunos de los genes de avirulencia virales implicados en el desencadenamiento de la HR en las interacciones que responden "gen a gen". Estos incluyen el gen que codifica para la CP, que se requiere para la inducción de las HRs conferidas por los genes N' en *N.sylvestris*, los genes L³ y L² en pimiento, y en *Solanum melongena* (Saito et al., 1987; Berzal-Herranz et al., 1995; de la Cruz et al., 1997; Dardick y Culver, 1997); el gen que codifica para la proteína de movimiento 30K es el gen Avr correspondiente a las HRs conferidas por los genes Tm-2 y Tm2² de tomate (Meshi et al., 1989; Weber et al., 1993), y el gen de la replicasa viral 126K se requiere para la inducción de la HR conferida por el gen N de *N.glutinosa* (Padget y Beachy, 1993).

I.4.1. La replicasa viral como inductor de la resistencia

El gen N de *Nicotiana glutinosa* es activo frente a la infección por todos los tobamovirus descritos, con la única excepción de la cepa Obuda de ToMV (ToMV-Ob) (Tobias *et al.*, 1982; Csyllery *et al.*, 1983). En los primeros estudios de la interacción tobamovirus-gen N se descartó que la proteína de movimiento o la proteína de cubierta del virus fueran las responsables de la inducción de la reacción hipersensible mediada por este gen (Culver *et al.*, 1991; Deom *et al.*, 1991). El análisis de mutantes de la cepa Ob indicaron que la alteración del gen de la replicasa o del producto de los genes 126K/183K activaban la respuesta de este gen (Paggett y Beachy, 1993). En plantas de *N. tabacum* cv Xanthi nc (genotipo NN) transformadas con el gen que codifica para la proteína 183K de TMV bajo el control de un promotor constitutivo, las plantas transgénicas no mostraron diferencias significativas con respecto a las plantas control (Dowson *et al.*, 1993). En 1997 Padgett *et al.*, utilizando virus quimeras entre el virus Ob y TMV, demostraron que la secuencia requerida para la inducción de la HR, correspondía al dominio helicasa de la replicasa viral. Este dominio se caracteriza por la unión de nucleósidos trifosfato y su hidrólisis, así como por la actividad de desenrollamiento del ARN (Gorbalenya y Keonin, 1993; Fernández *et al.*, 1995). Estudios recientes realizados por Abbin *et al.* (1998) y Les Erikson *et al.* (1999) han comprobado que motivos del dominio helicasa inducen la HR en plantas de tabaco con el gen N. Ambos grupos han determinado que la expresión transitoria de una región C-terminal (entre los nucleótidos 2082 y 3419 de la secuencia) de la proteína 126K de TMV es suficiente para inducir la HR frente al gen N. En los estudios llevados a cabo por Les Erikson (1999) se ha demostrado que la actividad inductora de este fragmento de la helicasa depende de sus características estructurales y no de su actividad ATPasa/helicasa. Puesto que el gen N tiene secuencias similares a receptores Toll de *Drosophila* y IL-1R de mamíferos (Whitham *et al.*, 1994) su funcionamiento podría ser como un receptor que interaccionaría con componentes de TMV (el dominio helicasa o la replicasa viral o un complejo proteico dependiente del dominio helicasa) y esto llevaría al desencadenamiento de la HR (Dinesh-Kumar *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998).

I.4.2. La proteína de movimiento como inductor de la resistencia

La proteína de movimiento de TMV funciona también como el determinante de avirulencia en plantas de tomate con los genes Tm2¹ y Tm2² de resistencia.

Análisis de cepas de ToMV que rompen la resistencia del gen Tm-2 de tomate revelaron que el cambio de dos aminoácidos en la proteína de movimiento es el responsable de que estas cepas sobrepasen la resistencia conferida por este gen (Meshi *et al.*, 1989). Estos dos aminoácidos se localizan en el extremo amino terminal de la proteína y esta proteína es suficiente, cuando se expresa de forma constitutiva en plantas de tomate con el gen Tm2, para inducir la reacción de defensa mediada por el gen Tm2 (Pfitzner y Pfitzner, 1992).

En tomate el gen de resistencia Tm-2² ha sido utilizado para controlar la infección por ToMV (Hall, 1980). En experimentos llevados a cabo para determinar el mecanismo de resistencia del gen Tm-2² se observó que el movimiento del virus está inhibido en estas plantas (Nishigushi y Motoyoshi, 1987). Cuando se analizaron las secuencias de dos cepas (ToMVLIIA y ToMV-2²) que rompen la resistencia de este gen se observó que se había producido el cambio de 4 aminoácidos en la MP de estas cepas con respecto a la cepa salvaje, siendo tres de estos cambios comunes a ambas cepas (Calder y Palukaitis, 1992; Weber *et al.*, 1993). La generación de virus recombinantes ha demostrado que los cambios de dos de estos aminoácidos son los responsables de que ToMV-2² rompa la resistencia conferida por el gen Tm2² (Weber *et al.*, 1993).

En 1998 Weber y Pfitzner comprobaron que efectivamente la resistencia conferida por el gen Tm2² opera por el reconocimiento del producto del gen de avirulencia, la proteína de movimiento, y que la actividad inductora de la resistencia recae en los últimos 30 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína.

1.4.3. La proteína de cubierta como inductor de la resistencia

Uno de los sistemas mejor estudiados ha sido la interacción del gen N' de *Nicotiana sylvestris* y TMV. El gen N' controla una HR cuando las plantas son infectadas por tobamovirus. Este gen no es eficaz frente a la cepa U1 de TMV, sin embargo mutantes de esta cepa son capaces de inducir la HR. Su estudio llevó a establecer que la CP actuaba como inductor de la resistencia ya que las mutaciones producidas en esta proteína son las que alteraban el reconocimiento del virus por el gen N' (Knorr y Dawson, 1988; Culver y Dawson, 1989; Saito *et al.*, 1989). Este es el primer gene de avirulencia caracterizado (Saito *et al.*, 1987; Weber *et al.*, 1993).

Posteriormente se comprobó que la expresión constitutiva de la CP de TMV y ToMV en plantas transgénicas con el gen *N'* es suficiente para inducir la resistencia en ausencia de cualquier otro producto viral (Culver y Dawson, 1991; Pfitzner y Pfitzner, 1992). Además mediante mutaciones puntuales en la secuencia aminoacídica de la CP que alteraban su estructura tridimensional ha comprobó que el producto del gen *N'* es capaz de reconocer la estructura espacial de esta proteína (Saito *et al.*, 1989; Taraporewala y Culver, 1997; Dardick *et al.*, 1999). Estos resultados, junto con los de experimentos anteriores, han llevado a concluir que la CP de los tobamovirus es el inductor viral de la resistencia mediada por el gen *N'* de *N.sylvestris*.

En plantas de *C.chinense* (L^3L^3) y de *C.frutescens* (L^2L^2) las investigaciones llevadas a cabo por Berzal-Herranz *et al.* (1995) y De la Cruz *et al.* (1997) demostraron que la proteína de cubierta de los tobamovirus se requiere para la inducción de la HR, aunque no se ha establecido que sea el único factor del virus responsable de la inducción de la HR, y determinaron mediante la construcción de genomas virales híbridos entre virus capaces de inducir la HR y virus no inductores de los genes de resistencia L^2 (De la Cruz *et al.*, 1997) y L^3 (Berzal-Herranz *et al.*, 1995), que la presencia de la CP de los tobamovirus PMMoV-S y PaMMV eran necesarias para inducir la resistencia mediada por estos genes.

En el huésped *Solanum melongena* se ha establecido, mediante la expresión transitoria en plantas, que las CPs de los tobamovirus son también los inductores virales de la resistencia (Dardick y Culver, 1997).

I.5.EXPRESIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA

Como hemos indicado anteriormente el reconocimiento específico de los factores de avirulencia del patógeno por los correspondientes factores de resistencia del huésped inicia una serie de procesos de señalización celular y sistémica (Scheel, 1998) que activan la maquinaria de defensa del huésped que culmina en la HR con la localización del patógeno en los sitios de infección primaria. Esta respuesta está asociada con la expresión coordinada de un conjunto de procesos celulares que contribuyen a una efectiva respuesta de defensa siendo los primeros en producirse: la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lamb y Dixon, 1997; Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Bestwick *et al.*, 1997), fortificación de la pared celular con la formación de depósitos de callosa (Thordal-Christensen *et al.*, 1997), activación

transcripcional de genes que participan en la respuesta de la planta, iniciación de la muerte celular (Heath, 1998).

1.5.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Hay cada vez más evidencias que señalan a que la generación de especies activas de oxígeno tales como O_2^- , H_2O_2 y OH^\cdot , forman parte de las reacciones iniciales que al menos en parte, son requeridas para la posterior activación de la respuesta de defensa asociadas a la HR (Mehdy, 1994; Baker y Orlyi, 1995; Low y Merida, 1996; Hammond-Kosack y Jones, 1996).

La producción de especies activas de oxígeno (ROS) juega un papel importante en la defensa vegetal. Doke y col (1983, 1988) fueron los primeros en señalar que en las interacciones incompatibles patata-*Phytophora infectans* y tabaco-TMV se producían aniones superóxido (O_2^-). En varios estudios (Levine *et al.*, 1994; Murphy y Auh, 1996) se ha confirmado que las plantas tienen un mecanismo para la producción de O_2^- que implica la acción de una NADPH oxidasa asociada a membrana. El O_2^- generado normalmente es rápidamente degradado, tanto de forma no enzimática como por la enzima superóxido dismutasa (SOD), que lo transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Así pues en muchos sistemas vegetales se ha detectado acumulación de H_2O_2 (Sutherly, 1991; Levine *et al.*, 1994; Mehdy, 1994; Nürnberger *et al.*, 1994). Ambos, H_2O_2 y O_2^- son moderadamente reactivos y el daño celular causado por ROS parece ser debido a su conversión en otras especies más reactivas. La protonación de O_2^- ocurre a bajos pH, como el que se da en la pared celular de las plantas, y rinde el radical hidroperoxilo ($H O_2^\cdot$). Este radical puede unirse a membranas biológicas y actuar directamente sobre los ácidos grasos dando lugar a lípidos peroxidados (Halliwell y Gutteridge, 1990) que pueden actuar como señales moleculares. Así mismo, por la reacción de Fenton el H_2O_2 puede dar lugar al radical hidroxilo (OH^\cdot) que puede también iniciar y perpetuar la peroxidación de lípidos. También es conocido que es capaz de fragmentar el DNA por sitios específicos (Halliwell y Gutteridge, 1990).

La formación de ROS durante las reacciones incompatibles se caracteriza por presentar dos fases (Keppler *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1991; Baker y Orlandi, 1995). La primera fase es relativamente corta y se da inmediatamente después de la infección con patógenos, tanto los que establecen reacciones compatibles como

incompatibles. Es una formación inespecífica. La segunda fase se desarrolla durante periodos más largos y es específica de las reacciones incompatibles.

Se ha propuesto que las especies reactivas de oxígeno podrían participar en diferentes procesos relacionados con la reacción de defensa vegetal. Así, estos compuestos, en los niveles en que son producidos por las plantas pueden ser tóxicos para los microorganismos (Peng y Kuc, 1992) y también debido a su toxicidad activarían el proceso de muerte celular (Baker y Orlandi, 1995). Además el H_2O_2 puede contribuir al reforzamiento estructural de las paredes celulares ya que es esencial para la formación de precursores de la lignina vía actividad peroxidasa (Bolwell *et al.*, 1995). Podría también incrementar la actividad de enzimas requeridas para la biosíntesis del ácido salicílico (Leon *et al.*, 1995).

Las ROS están implicadas en la activación de mecanismos de defensa tales como la síntesis de fitoalexinas y la activación de genes de defensa (Jabs *et al.*, 1997) como el de la fenil-amonio-liasa (PAL) (Lamb y Dixon, 1997), de la muerte celular programada (Jabs *et al.*, 1996; Levine *et al.*, 1996) y la de ciertos mecanismos de protección como la expresión del gen de la glutation-S-transferasa (Levine *et al.*, 1994) en células adyacentes a la infectada.

Se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido durante la HR es capaz de disparar la señal de genes antioxidantes en tejidos adyacentes (Levine *et al.*, 1994; Inzé y Van Montagu, 1995). Esto parece indicar que bajos niveles de ROS pueden actuar como señales celulares de protección endógena, lo que puede que sea el limitante del tamaño de la lesión.

1.5.2. Fortificación de la pared celular

La callosa es un polímero de β -1,3-glucano y es sintetizado por la enzima callosa sintasa localizada en la membrana plasmática. La rápida deposición de callosa en las paredes celulares de las células vegetales está frecuentemente asociada con una interacción huésped-patógeno incompatible. Se ha observado en cultivos celulares expuestos a inductores derivados de patógenos o en tejidos dañados por herida (Kauss, 1990).

La callosa no sólo se deposita en la pared celular, sino que también se observan depósitos de este polímero en plasmodesmos, por lo que se ha supuesto

que el bloqueo de los plasmodesmos con callosa es un componente esencial de la respuesta de defensa antiviral y que sería requerida para impedir el movimiento célula a célula de los virus (Beffa et al., 1996).

Igualmente, se ha observado una elevación local del contenido del polímero lignina en las paredes celulares (Whetten y Sederoff, 1995) y además se ha comprobado que un grupo de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) se inducen en respuesta a interacciones incompatibles. Se piensa que estas proteínas juegan un papel importante en la organización de la arquitectura primaria de la pared celular y podrían actuar como focos para la iniciación de la polimerización de la lignina (Showalter, 1993; Bolwell et al., 1995).

1.5.3. Formación de moléculas señal

La HR y la resistencia sistémica adquirida son dos procesos de defensa activa de las plantas frente a patógenos. Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios para determinar las moléculas señal que intervienen en la activación de ambos procesos.

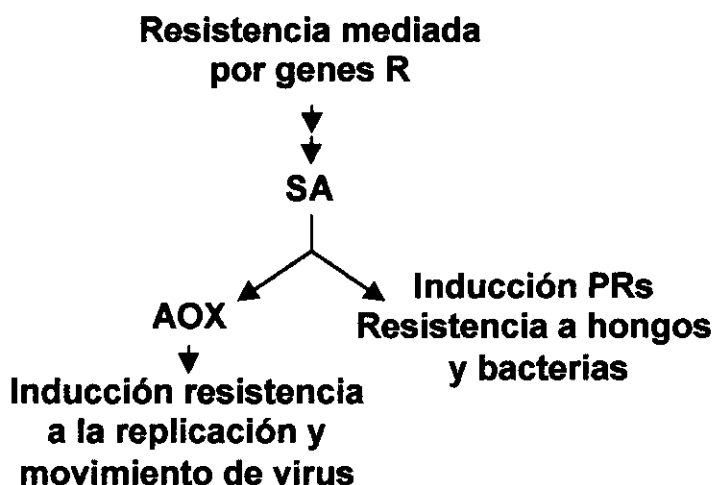
Existen numerosas evidencias que indican que el ácido salicílico es un componente esencial en la activación de ambos procesos (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Ryals et al., 1996; Dempsey et al., 1999).

Se ha observado que en las interacciones huésped-patógeno incompatibles existe una clara correlación entre el incremento de SA endógeno y de sus conjugados glucosilados, la expresión de los genes que codifican las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) y el desarrollo de la resistencia a la enfermedad (Malamy et al., 1990; Metraux et al., 1990; Uknes et al., 1993a; Dempsey et al., 1997). Además la aplicación exógena de SA y de sus análogos el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) o el ácido benzo(1,2,3)-thiazol-7-carbothioico S-metil ester (BTH) inducen la expresión de los genes de las proteínas PRs (Antoniw y White, 1980; Ward et al., 1991) y de la resistencia frente a patógenos (White, 1979; Ukness et al., 1993a).

Los estudios realizados en plantas de tabaco y *Arabidopsis* que expresan constitutivamente el gen bacteriano *nahG*, y que por tanto no acumula SA, ha permitido demostrar la participación de este compuesto en el mecanismo de resistencia de la planta (Gaffney et al., 1993; Shah et al., 1999).

La aplicación de SA exógeno puede inducir resistencia a virus, incluso en plantas que carecen de genes de resistencia frente a ellos (White et al., 1983; Chivasa et al., 1997). Potencialmente el SA puede actuar tanto sobre la replicación, como sobre el movimiento a corta distancia a través de plasmodesmos y/o a larga distancia a través del floema. Se ha visto que es capaz de inhibir la resplicación de TMV y PVX en plantas de tabaco no susceptibles interrumpiendo su replicación (Chivasa et al., 1997; Naylor et al., 1998). También es capaz de disminuir la relación en los niveles de acumulación de ARN genómico/ARN subgenómico. Así mismo, se ha observado que es capaz de inhibir la entrada de CMV en los vasos de plantas de tabaco impidiendo así el movimiento a larga distancia del virus (Naylor et al., 1998).

Se ha postulado que la ruta de transducción de señal a partir del ácido salicílico se separa en dos ramas, una de ellas conduciría a la inducción de la resistencia frente a virus, y la otra a la resistencia frente a hongos y bacterias, y a la producción de PRs (Chivasa et al., 1997).



Aunque el ácido salicílico es requerido para la expresión de la resistencia en distintas especies vegetales se ha observado también que algunas de las respuestas de defensa son activadas por rutas independientes de la del ácido salicílico (Dong, 1998; Pietersen y Van Loon, 1999; Guo et al., 2000).

Tanto el ácido jasmónico (JA) como el etileno pueden funcionar como señales en la inducción de estas respuestas alternativas (Lund et al. 1998, Pieterse et al., 1998).

La hormona etileno regula los procesos de crecimiento, desarrollo y senescencia en plantas (Ecker y Theologist, 1994; Keiber, 1997), y participa también en la respuesta de defensa en plantas (Boller, 1991). La inoculación con el virus TMV de plantas de tabaco con el gen N induce la formación de lesiones locales necróticas que está acompañado de un incremento de la producción de etileno paralelamente al desarrollo de las LLN (Nakagaki et al., 1970; Pritchard y Ross, 1975; De Laat y Van Loon, 1981). Se piensa que esta hormona es capaz de intervenir en las reacciones de resistencia en plantas mediante la activación transcripcional de genes tales como los de PRs básicas (Kombrink y Somssich, 1997), fenil amonía-liasa, y polifenol oxidasa, y de la inducción de la síntesis de compuestos que pueden actuar como mediadores de la resistencia, compuestos fenólicos, ligninas y suberinas que son capaces de suprimir la multiplicación de los patógenos en los tejidos infectados y en los adyacentes (Pritchard y Ross, 1975; Boller, 1991; Vera et al., 1993).

El ácido jasmónico (JA) y su derivado el metiljasmonato (MeJA), son moléculas reguladoras de la expresión de genes que participan en el desarrollo de las plantas (Koda, 1992) y en la respuesta de la planta frente a daños mecánicos (Dammann et al., 1997), y a condiciones de estrés biótico y abiótico (Reinbothe et al., 1994). Al igual que el etileno se ha demostrado que existe una inducción en la síntesis de ácido jasmónico durante la respuesta de defensa en la planta y que el JA actúa como un inductor de la expresión de genes específicos. A su vez se ha demostrado esta activación con aplicaciones exógenas de JA (Andersen et al., 1992; Epple et al., 1995).

La ruta dependiente del ácido salicílico y la dependiente del jasmónico/etileno interaccionan de forma antagónica de forma que el SA inhibe la síntesis de JA y etileno y la/las rutas activadas por estas hormonas (Pennazio et al., 1985; Leslie y Romani, 1988; Peña-Cortés et al., 1993; Doares et al., 1995). Sin embargo ambas rutas se activan en respuesta a la infección por patógenos. Recientemente se ha sugerido que estas rutas no funcionan de forma independiente, sino que pueden regular la expresión temporal y /o amplitud de la otra ruta (Shah et al., 1999).

1.5.4. Inducción de genes de resistencia

Una vez que las moléculas inductoras de la resistencia interaccionan con los correspondientes genes de resistencia se produce unas señales primarias (Shirasu et

al., 1996) que llevan a la activación de genes asociados a los mecanismos de defensa. Los patrones de expresión de estos genes que se inducen en tejidos infectados son muy diferentes, tanto por el tiempo que tardan en expresarse como por su cantidad (Somssich et al., 1989; Zhu et al., 1996). La acumulación de estos mRNA generalmente comienza localmente desde minutos a horas después de la infección alrededor de los sitios de infección, y algunas horas después se inicia la acumulación en sitios alejados del punto de infección resultado de la respuesta sistémica. La identificación de estos genes ha revelado su implicación en rutas tanto del metabolismo primario como secundario (Somssich y Hahlbrock, 1998). A este respecto, los productos del metabolismo secundario han sido estudiados de forma preferente, tanto porque generan productos estructurales, como productos que tienen actividades antimicrobianas o la capacidad de alterar la pared celular (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Dixon y Paiva, 1995; Smith, 1996).

De la ruta del fenilpropanoico se ha caracterizado la expresión de tres enzimas, la fenilamonioliasa, la cinamato 4-hidroxilasa y la 4-cumarato CoA ligasa, que está fuertemente inducida por la infección de patógenos (Hahlbrock et al., 1995). Su inducción lleva a la formación de compuestos fenólicos tanto solubles como unidos a la pared que tienden a acumularse de forma específica en tejidos infectados. En muchos sistemas las fitoalexinas se producen mayoritariamente entre los compuestos fenólicos solubles (Smith, 1996).

Se ha demostrado que los genes que codifican para las enzimas que activan el ciclo metil, como son la S-adenosil-metionina sintetasa y la S-adenosil homocisteína hidrolasa, se inducen transcripcionalmente para producir grupos metilos necesarios para la síntesis de etileno y para los numerosos pasos de metilación implicados en la formación de los metabolitos secundarios (Kombrick y Somssich, 1995).

En muchas reacciones incompatibles se ha observado la rápida y masiva inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) tanto en los lugares primarios de infección como en lugares más alejados (Kombrick y Somssich, 1997). Las proteínas PRs agrupan a un amplio grupo de proteínas distribuidas en diferentes clases, con diferencias estructurales y funcionales. La acumulación de proteínas PRs representa el mayor cambio cuantitativo en la composición de proteínas que se produce durante la HR.

1.5.5. Muerte celular

La muerte celular programada (PCD) es un proceso activo de muerte celular que se da durante el desarrollo de las plantas y en respuesta a situaciones ambientales. En plantas este proceso es esencial para el desarrollo y supervivencia de las mismas y también, al igual que en células animales podría constituir una respuesta de defensa frente a patógenos en plantas (Dang et al., 1996). De hecho, una de las respuestas celulares más características de la reacción de defensa en plantas es la inducción de la muerte celular localizada (HR) en el lugar de infección.

La inducción de la HR por patógenos e inductores de la resistencia es similar en cierto modo a la apoptosis en células animales (Dangl et al., 1996), puesto que ambos procesos tienen en común fenómenos tales como el fraccionamiento del ADN con extremos 3'OH, embebimiento de la membrana plasmática así como condensación nuclear y plasmática en algunas células alrededor de la HR (Mittler et al., 1995; Levine et al., 1996; Wang et al., 1996; Ryerson y Heath, 1996; Gilchrist, 1998). Entre los fenómenos más tempranos están el flujo de Ca^{2+} , el intercambio de H^+ por K^+ dentro de la célula (que lleva a una acidificación de la célula), y la apertura de canales aniónicos especialmente canales de cloro (Atkinson et al., 1985; Baker et al., 1987; Davis et al., 1991).

Además, la HR está controlada genéticamente (Greenberg et al., 1994; Dietrich et al., 1994) y requiere para su activación que la planta esté transcripcionalmente activa (He et al., 1993).

Los virus son parásitos intracelulares obligados y necesitan de la maquinaria celular del hospedador para su replicación. Considerando esto la muerte celular parece una buena forma de bloquear el desarrollo del patógeno. Además la HR genera el aislamiento mecánico de la célula infectada y se puede pensar que este fenómeno previene la diseminación del virus por la planta. Sin embargo en estudios llevados a cabo con el gen N frente al virus del mosaico del tabaco (TMV) las partículas virales se pueden encontrar en las células que rodean a la lesión necrótica incluso cuando la expansión de la lesión ha cesado (De Graça y Martín, 1976). Con lo cual la muerte celular no sería el único mecanismo que frena la expansión del patógeno. Recientemente se ha comprobado en plantas de *Arabidopsis* con la mutación *dnd1*, que la muerte celular está separada y es independiente de los mecanismos de resistencia que llevan a la

localización del patógeno. En el fenotipo desarrollado en este tipo de plantas la HR se pierde sin que por ello la resistencia a la enfermedad se vea afectada (Yu et al., 1998).

I.6. RESISTENCIA INDUCIDA

Además de los mecanismos descritos anteriormente las plantas poseen un nivel adicional de resistencia que es conferida por la inoculación previa con un virus. Esta resistencia inducida puede ser de varios tipos.

I.6.1. Protección cruzada

La protección cruzada o interferencia es la capacidad de un virus para prevenir la infección por un segundo virus (Dodds, 1982). Fue descubierta por McKinney en 1929, cuando observó que plantas de tabaco que estaban infectadas por una cepa atenuada de TMV eran protegidas frente a otras cepas más agresivas de este virus. La interferencia se observa mejor en aquellos virus que causan lesiones locales necróticas. Se conoce por ejemplo que el número de lesiones producidas en *N. sylvestris* por la cepa U2 de TMV puede ser drásticamente reducida por la presencia en el inóculo de la cepa U1. Este fenómeno se ha descrito en distintas especies vegetales y únicamente en el caso de algunos virus ha podido ser demostrada. La protección cruzada ha sido ampliamente utilizada para establecer relaciones entre cepas de virus y ha sido de interés potencial para la protección de plantas frente a virus en el campo (Mathews, 1991). La protección cruzada no ha sido sólo observada entre virus, también se ha demostrado en viroides (Nibblet et al., 1978) o satélites de virus de plantas (Jacquemond y Tepfer, 1993). En general para que el virus "protector" confiera protección es necesario que se establezca en la planta antes de la llegada del virus "desafiante". La protección cruzada está limitada a virus que están estrechamente relacionados, y se han propuesto una serie de mecanismos para explicar este tipo de resistencia.:

- la proteína de la cápsida del virus protector encapsida el ARN del virus desafiante e inhibe su expresión
- el ARN del virus desafiante hibrida con las cadenas complementarias del ARN del virus protector que se está replicando activamente en la célula
- el virus protector impide el movimiento del virus desafiante hacia las hojas superiores

- el virus protector reduce los metabolitos del hospedador y/o ocupa las estructuras del hospedador que requiere el virus desafiante para su replicación y multiplicación.

1.6.2. Resistencia adquirida

La resistencia adquirida es un fenómeno por el cual la infección de un huésped por un virus induce una resistencia frente a posteriores infecciones por el mismo u otros virus. Ross (1961a) observó en plantas de tabaco Samsun NN que habían sido inoculadas con TMV se desarrollaba resistencia a virus desafiante en zonas de entre 1 y 2 mm alrededor de las lesiones locales necróticas inducidas por la HR. A este fenómeno se le llamó resistencia localizada adquirida (LAR). Ross (1961b) también observó que se producía un fenómeno de resistencia sistémica adquirida (SAR) en zonas más allá de las denominadas LAR, tanto en las hojas inoculadas en tejidos distantes de las lesiones como en las hojas no inoculadas. Muchos estudios posteriores han demostrado que la SAR proporciona un bajo, aunque significativo, nivel de resistencia frente a un amplio rango de patógenos, ya que sólo una parte de los sistemas de defensa que se expresan localmente se desencadenan en tejidos con SAR (Ryals et al., 1996). Se ha propuesto un modelo por el cual el confinamiento del patógeno a los lugares primarios de infección se debe a la combinación de los efectos de la HR y la LAR (Dorey et al., 1997), mientras que la SAR funcionaría como un mecanismo potenciador de la respuesta de defensa en tejidos no infectados de la planta (Ryals et al., 1996).

I.7. OBJETIVOS

La determinación de los componentes virales que actúan como inductores de la resistencia en plantas ha permitido una mayor profundización en el conocimiento de los procesos biológicos que tienen lugar en el establecimiento de las interacciones huésped-virus. Así mismo el estudio de los mecanismos de resistencia natural que opera frente a virus en plantas permitirá, en un futuro, desarrollar estrategias más eficaz que las actuales para el control de las enfermedades virales.

En estudios anteriores se ha establecido que la proteína de la cápsida de los tobamovirus PaMMV y PMMoV-S es el determinante viral requerido para la inducción de la respuesta de defensa en plantas de *C. frutescens* (L^2L^2) y de *C. chinense* (L^3L^3) respectivamente. Además se comprobó que la capacidad de inducir la HR reside en la proteína y no en el mRNA (De la Cruz et al., 1997; Berzal-Herranz et al., 1995). Sin embargo estos estudios no permitieron descartar la participación en la inducción de la HR de otros componentes virales y/o de los procesos asociados a la replicación viral.

Basándonos en estos estudios, en este trabajo nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Identificación de los factores virales responsables de la inducción específica de la resistencia activa (HR) mediada por los genes de la serie alélica L (L^2L^4) en plantas del género *Capsicum*
2. Estudio de la respuesta de defensa en plantas de *C. chinense* (L^3L^3) frente a la infección por la cepa española del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-S).
3. Identificación de genes inducibles en *C. chinense* (L^3L^3) en los procesos de resistencia frente a tobamovirus
4. Estudio de la resistencia inducida, frente a virus heterólogos, por la cepa española de PMMoV en plantas de *C. chinense* (L^3L^3).

MATERIALES Y METODOS

II.MATERIALES Y METODOS

II.1.VIRUS

Virus del moteado suave del pimiento cepa española (PMMoV-S): descrito por García-Luque *et al.* (1990).

Virus del moteado suave del pimiento cepa italiana (PMMoV-I): descrito por Wetter *et al.* (1984) y cedido por el Dr. M. Conti (Italia).

Virus del moteado suave de la páprika (PaMMV): aislado y descrito por Rast (Holanda) (Tobias *et al.*, 1982).

Los virus se conservan a 4  C como desecados sobre CaCl   de muestras de hojas de las plantas infectadas.

II.2.PLANTAS DE ENSAYO

Capsicum frutescens L. Cv. "Tabasco" (L  L  )

Capsicum chinense N. J. Jacq. "PI 159236" (L  L  )

Capsicum chacoense Hunz "1002" (L  L  )

Nicotiana benthamiana Domin

Nicotiana sylvestris L.

II.3.BACTERIAS

Escherichia coli DH5   (Hanahan, 1983)

Escherichia coli SURE (Clontech)

II.4.CEBADORES

Cebadores	Secuencia	Nucleótidos que abarca de la secuencia de los virus	
CP1	5'CTGTGTACTTCGGCGTTAGG3'	5763-5783	ARN PMMoV
CP2	5'AATTCCTCAACATCGGGTCC3'	6139-6159	Complementaria al ARN de PMMoV
NCP1	5'CGAATTCCATGGCTTACACAGTT3'	5685-5700	ARN PMMoV
ECP2	5'CGAGATATCTTAATTGCGTTCCATC3'	6260-6277	Complementaria al ARN de PMMoV
CPPa5'	5'GATAATCATGCCTTATACTGTATCTTC3'	1039-1059	ARN de PaMMV
CPPa3'	5'CCCTTCGATTTAAGTGGTGGGATAACA3'	1586-1613	Complementaria al ARN de PaMMV

Los cebadores universales #1224 de M13/pUC (Reverso) y #1233 del mismo fago (directo) (New England Biolabs).

II.5. VECTORES

pT3T7 y pT3T7BM (Boehringer). Se utilizaron para la clonación de fragmentos de ADN procedentes de reacciones de PCR y para subclonar a partir de clones preexistentes.

pMDJ82 (Dowson Day, 1994). Vector de expresión transitoria de genes en plantas. La secuencia se inserta entre el promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor que controla su expresión y el nos terminador de la nopalina sintetasa. Cedido por Dr. Dowson Day (Universidad de Sussex, Brighton, UK).

pP2C2S (Chapman *et al.*, 1992). Vector de expresión transitoria de genes en plantas. La expresión se encuentra controlada por el promotor de la proteína de la cápsida del virus X de la patata. Cedido por Prof. Baulcome (Sainsbury Laboratory, Norwich, UK)

pDE1001gn1/GUS (Castresana *et al.*, 1990): plásmido que tiene el gen de la β -glucuronidasa insertado en el sitio BamHI del plásmido pDE1001. La expresión de la enzima se encuentra bajo la acción del promotor del gen *gn1* de la β -1,3-glucanasa de *Nicotiana plumbaginifolia*. Cedido por Dra. Castresana (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid).

II.6. INMUNOSUEROS

Anti PMMoV y anti PaMMV: inmunosueros de conejo específicos de las proteínas de cubierta de ambos virus. Preparados en el laboratorio de la Dra. M^a Teresa Serra.

Anti PVX: inmunosuero de cabra específico de la CP de PVX de Boehringer Mannheim.

Anti p14 de tomate: inmunosuero de conejo específico de la proteína p14 aislada de plantas de tomate infectadas por el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) (Vera *et al.*, 1988) cedido por el Dr. Conejero (E.T.S.I. Agrónomos. Valencia).

II.7.TAMPONES Y SOLUCIONES GENERALES

Tampónes de inoculación	
Virus	tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7.0
Transcritos	50 mM glicina, 30 mM K ₂ HPO ₄ , 1 % bentonita, 1% celite

Tampónes de electroforesis de ácidos nucleicos	
TAE	Tris-acetato 40 mM, pH 7,8, EDTA 1 mM
TBE	Tris-borato 45 mM, pH 8,4, EDTA 1 mM
Carga en geles de agarosa	glicerol 50%, EDTA 50 mM, azul de bromofenol 0.1% y xylene cyanol 0.1%
MOPS	MOPS 40 mM, acetato sódico 10mM, EDTA 1 mM, pH 7.0.
SSC	NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7.0

Tampónes de electroforesis de proteínas	
SDS-PAGE	Tris 25 mM, glicina 190 mM,, pH 8,3, SDS 0.1%
Transferencia	Tris 25 mM, glicina 190 mM,, pH 8,3, metanol 20%
Tampón disociador	Tris-HCl 62.5 mM, pH 6,8, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2%, glicerol 10%.
PBS	NaCl 150 mM, fosfato sódico 10 mM, pH 7,2
PBST	PBS, 0.05% Tween 20

II.2.METODOS

II.2.1.Cultivo de plantas en tierra

Las plantas se mantuvieron en cámaras de cultivo a una temperatura de 25°C, humedad relativa del 60%, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y una intensidad lumínica de 10.000 lux.

II.2.2.Inoculación de virus en plantas de los géneros *Nicotiana* y *Capsicum*

Las plantas fueron inoculadas de forma mecánica utilizando como abrasivo celite y como inóculo diferentes concentraciones de los tobamovirus purificados y de PVX que fueron diluidas en tampón de inoculación de virus.

II.2.3.Cultivo de plantas *in vitro*

Para el cultivo de plantas *in vitro* se esterilizaron las semillas durante 20 minutos en lejía (0.2 g/L) seguido de 4 lavados con agua destilada estéril. Las plantas se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) en cámara de cultivo a 23°C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y una intensidad lumínica de 10.000 lux. Las plantas se utilizaron entre 6-8 semanas después de su germinación para los experimentos de expresión transitoria de genes virales.

II.2.4.Purificación de virus

Los virus detallados anteriormente se inocularon en plantas de *N.benthamiana* a una concentración de 50 µg/ml en tampón de inoculación. Diez días después de la inoculación (d.p.i.) los virus PaMMV y PMMoV se purificaron según el método de García-Luque et al. (1990) y PVX según el método de .

La concentración viral se calculó por métodos espectrofotométricos utilizándose un valor de $E_{260,0.1\%}=3$ (Wetter et al., 1984).

II.2.5.Obtención de células competentes y transformación

La obtención de células competentes de *E.coli* DH5α y SURE se realizó por los métodos de CaCl₂ (Sambrook et al., 1989) y de RbCl (Hanahan, 1983). Su transformación se llevó a cabo por el método del "shock" térmico descrito en Sambrook et al., 1989.

Una vez transformadas las bacterias se cultivaron a 30-37°C en medio LB (Sambrook et al., 1989).

II.2.6.Purificación de ADN plasmídico

Para la purificación de plásmidos a pequeña escala a partir de cultivos bacterianos se utilizó el método de lisis alcalina descrito en Sambrook *et al.* (1989). Para las purificaciones a gran escala se utilizó el "Plasmid Midi Kit" de QUIAGEN.

La cuantificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo espectrofotométricamente considerando un coeficiente $E_{260} 0.1\% = 21$ para DNA (Billeter *et al.*, 1966).

II.2.7.Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN se separaron en geles horizontales de agarosa del 0.8% al 1% en TAE. Para visualizar las bandas se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 1.2 μM . Las muestras se prepararon en tampón de carga para ácidos nucleicos. Cuando se trataba de muestras de ARN todo el material empleado se limpiaba con SDS al 10%.

II.2.8.Elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Se utilizaron dos sistemas para la elución de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

En el primero de ellos se utilizó el kit de "GeneClean" de BIO 101 Inc para eluir el ADN de las bandas cortadas a partir del gel de agarosa.

En el segundo sistema después de separar las muestras en un gel de agarosa libre de ADNasas, las bandas de interés se cortaron y se transfirieron a un tubo eppendorf. Se añadió un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) en una proporción de 1 mg/ml y se trituró la agarosa. Posteriormente el homogeneizado se mantuvo a -80°C durante 2 minutos. Después de centrifugar a temperatura ambiente durante 15 minutos a 13.000 r.p.m. en una microcentrífuga se recogió la fase superior y se repitió este paso de fenolización dos veces. Por último se recogió de nuevo la fase superior y se añadió 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 5.3 y dos volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitar a -20°C durante 16 horas.

II.2.9.Construcción de genomas virales híbridos

II.2.9.1.Clonaje de la CP de PaMMV

Clonaje en pT3T7

Para el clonaje del cADN de la proteína de cubierta de PaMMV se utilizó el clon THG-2 (de la Cruz *et al.*, 1997) y se mutagenizó el extremo 5' por PCR para incluir en la secuencia la diana de restricción Stu I junto al ATG inicial de la proteína de cubierta. Para la amplificación del fragmento de ADN que codifica para la CP se utilizaron los cebadores CPPa5' y CPPa3'. El fragmento amplificado fue de 568 bp correspondientes a los 485 nucleótidos que codifican para la CP del virus y los primeros 83 nucleótidos del extremo 3' no codificador del virus. Los extremos se rellenaron con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa. El fragmento se eluyó de un gel de agarosa y se clonó en el vector pT3T7 que había sido previamente digerido con la enzima XbaI, rellenados sus extremos con la enzima Klenow ADN polimerasa y defosforilados. En los clones obtenidos se comprobó que la orientación y secuencia del inserto era la correcta. Se seleccionó uno de dichos clones para los posteriores pasos de clonación. Este clon se denominó pT-CPPa

Clonaje en pPC2S

Para el clonaje del ADN de la CP del virus PaMMV en el vector de expresión en plantas pPC2S derivado del virus PVX, el plásmido pT-CPPa se digirió con la enzima EcoRI, se rellenó ese extremo con el fragmento Klenow ADN polimerasa, y se volvió a digerir con la enzima Sal I. El fragmento una vez eluido de un gel de agarosa se clonó en el vector pPC2S previamente digerido con las enzimas EcoRV/SalI y defosforilado. Al plásmido resultante se le llamó pPVXCPPa.

Clonaje en pMJD82

Para el clonaje de la secuencia de la CP de PaMMV en el vector pMJD82 se digirió el plásmido pT-CPPa con las enzimas StuI y PstI. El fragmento obtenido se separó en un gel de agarosa y se eluyó la banda correspondiente al gen de la CP. Este fragmento se clonó en el plásmido pMJD82 que previamente había sido digerido con las enzimas NcoI, rellenado este extremo con el fragmento Klenow, digerido de nuevo con la enzima PstI y defosforilado.

II.2.9.2.Clonaje de la CP de PMMoV-S

Clonaje en pT3T7BM

Para el clonaje de la proteína de cubierta de PMMoV-S en los vectores de expresión en plantas se utilizó el clon pSS-2 (Berzal-Herranz et al., 1995) y se amplificó por PCR con los cebadores NCP1 y el cebador universal 1233 M13/pUC (New England Biolabs). El fragmento obtenido de la PCR fue digerido con la enzima Afl III, seguido de una incubación con el fragmento Klenow, y de una digestión con Nco I. El fragmento de 594 bp resultante estaba constituido por 474 bp correspondientes a la secuencia de la CP y 120 bp correspondientes al extremo 3' no codificador del ARN viral. Este fragmento fue clonado en el plásmido pT3T7BM (Boehringuer) en los sitios de restricción Nco I-Hind III. Se corroboró la correcta secuencia de la CP de PMMoV-S y se seleccionó uno de los clones obtenidos, denominándolo pT-CPS para su utilización en los posteriores pasos de clonaje.

Clonaje en pPC2S

Para clonar la secuencia de ADN correspondiente a la CP de PMMoV-S en el plásmido pPC2S, el plásmido pT-CPS se digirió con la enzima de restricción Hind III, se rellenó este extremo con el fragmento Klenow, y se digirió de nuevo con la enzima Sal I. El producto de la digestión se separó por electroforesis en un gel de agarosa, y el fragmento eluido se clonó en el vector pPC2S que había sido previamente digerido con las enzimas Eco RV/Sal I. Al clon resultante que contenía la CP de PMMoV-S se le denominó pPVX-CPS.

Clonaje en pMJD82

Para el clonaje de la secuencia de la CP de este virus en el vector pMJD82 el plásmido pT-CPS se digirió con las enzimas de restricción Sty I y Xba I. El producto de la digestión se separó en un gel de agarosa y se eluyó la banda correspondiente a la CP. Este fragmento se subclonó en el vector pMJD82 que había sido digerido con las mismas enzimas y se había defosforilado.

II.2.9.3.Clonaje de la CP de PMMoV-I

Clonaje en pT3T7BM

La estrategia de clonación seguida se basó en trabajos anteriores de nuestro grupo en los que se demostró que el dominio viral responsable de la capacidad de PMMoV-I para romper la resistencia conferida por el gen L^3 se encontraba en los 287 nucleótidos del extremo 3' de la secuencia del virus (que corresponde a la región 3' codificadora de la proteína de cubierta y la región 3' no codificadora). Se comprobó que la introducción de un cambio aminoacídico en la secuencia proteica de la CP de PMMoV-I de Asn₁₃₈ por Met₁₃₈, daba lugar a un cambio en el fenotipo de esta cepa pasando a ser sensible a la acción del gen de resistencia L^3 de *C.chinense* (Berzal-Herranz *et al.*, 1995). Así pues se procedió a la clonación de la secuencia de un gen híbrido entre las proteínas de cubierta de las cepas S e I de PMMoV de forma que contuviera el extremo 5' de la CP de la cepa española y el extremo 3' de la CP de la cepa italiana, junto a la región 3' no codificadora de esta última cepa.

Dos clones pT-CPS (contiene la CP de PMMoV-S) y pl05 (Berzal-Herranz *et al.*, 1995) (contiene la CP de PMMoV-I) se utilizaron para obtener el plásmido pT-CPI que contiene la secuencia nucleotídica de la proteína híbrida. Este plásmido se obtuvo por una triple ligación de los siguientes fragmentos:

- fragmento del plásmido pT-CPS digerido con Hind III-Bsp HI que contiene los nucleótidos 5685-6070 de la CP de PMMoV-S
- fragmento del plásmido pl05 (Berzal-Herranz, 1995) digerido con Afl III, rellenados los extremos con el fragmento Klenow, y digerido con Bsp HI que contiene los nucleótidos 6071-6283 de la secuencia de PMMoV-I
- vector pT3T7BM digerido con Nco I y Eco RV.

Al plásmido resultante se le denominó pT-CPI y se corrobó su secuencia para determinar que era correcta.

Clonaje en pPC2S

Para clonar la proteína de cubierta híbrida en el vector pPC2S se digirió el plásmido pT-CPI con la enzima de restricción Hind III, el plásmido digerido se trató con el fragmento Klenow, y se digirió de nuevo con la enzima Sal I. El fragmento digerido de 618 bp fue separado por electroforesis en un gel de agarosa y una vez eluído se clonó en el vector pPC2S que había sido previamente digerido con las enzimas Eco RV/Sal I. El plásmido resultante fue denominado pVX-CPI.

Clonaje en pMJD82

Para clonar la secuencia de la CP híbrida en el vector pMJD82 se digirió el vector pT-CPI con las enzimas Sty I y Xba I. El producto de la digestión se separó por electroforesis en un gel de agarosa y el fragmento correspondiente a la CP se clonó en el vector pMJD82 digerido con las mismas enzimas y defosforilado.

II.2.9.4. Clonaje del gen GUS en el vector pMJD82

Para clonar la secuencia del gen GUS en el vector de expresión en plantas pMJD82 se digirió el plásmido pBI121 con las enzimas XbaI y EcoRI. El producto de la digestión se separó en un gel de agarosa y el fragmento de 2752 bp correspondientes a la secuencia codificadora del gen GUS bajo el promotor 35s de CaMV y con el sitio de poliadenilación de la nopalina sintetasa (NOS-ter), se eluyó y se clonó en el plásmido pMJD82 digerido con las enzimas de restricción XbaI y EcoRI. Al plásmido resultante se le denominó pMJD-GUS.

II.2.10. Secuenciación de ADN y análisis de las secuencias

En el proceso de secuenciación se siguió el proceso de “prime walking” descrito en Strauss *et al.* (1986). Se utilizó la enzima FS Amplitaq ADN polimerasa para las reacciones de amplificación usando terminadores marcados (kit “ABI PRISM™” DE Perkin Elmer. Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos universales “forward” y “reverse” del bacteriófago M13 y los correspondientes a cada una de las secuencias de los fragmentos de ADN de interés. Los productos de reacción se analizaron en un secuenciador automático (ABI PRISM 377) de Perkin Elmer. Los programas BLAST y BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) se utilizaron para el análisis, alineamiento y comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.

II.2.11. Generación de transcritos virales

Los transcritos virales se generaron a partir de los plásmidos con las construcciones pVX-CPPa, pVX-CPS, pVX-CPI y pP2C2S por transcripción *in vitro* con la T7 ARN polimerasa una vez que los plásmidos habían sido digeridos con la enzima SpeI. Los transcritos con la estructura Cap fueron sintetizados con el kit T7 Cap-Scribe (Boehringer Mannheim). La cantidad e integridad de los transcritos se analizó por electroforesis en geles de agarosa. Las reacciones se pararon cuando se

les añadió EDTA pH 8.0 hasta una concentración 20 mM. Finalmente a estas reacciones se les añadió tampón de inoculación de transcritos.

II.2.12.Propagación de virus quimeras en plantas

Plantas de *N.benthamiana* Domin fueron inoculadas con transcritos virales generados *in vitro* con las construcciones derivadas del vector pP2Cs (pPVX-CPPa, pPVX-CPS, pPVX-CPI y pPVX). Se siguió la evolución de la infección en hojas inoculadas y hojas superiores no inoculadas entre 1 y 7 d.p.i. Las proteínas de cubierta de los tobamovirus y de PVX se cuantificaron utilizando los ensayos ELISA-DAS y Western Blot utilizando los inmunosueros específicos de las proteínas de cubierta de cada virus.

II.2.13.Detección de las proteínas de cubierta virales mediante ELISA-DAS

La detección y cuantificación de las proteínas de cubierta de los tobamovirus y de PVX en extractos de plantas infectadas se realizó como se describe en Berzal-Herraz et al. (1995) utilizando para ello los inmunosueros adecuados para cada virus. Para PaMMV y PMMoV se utilizaron los inmunosueros elaborados en nuestro laboratorio y para PVX un suero comercial (Boehringer).

Las muestras se prepararon triturando tejido fresco de hoja con tampón PBST-BSA 0.2% en una proporción de 10 µl por cada mg de tejido fresco. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 2' a 13.000 r.p.m. en una microcentrífuga. Se ensayaron diluciones crecientes de cada una de las muestras para determinar la concentración viral referida a la curva patrón de cada virus.

La O.D. de las muestras de las placas se midió en un lector de microplacas EAR 400 SLT-Labinstruments a una longitud de onda de 405 nm.

Todas las diluciones de las IgG, IgG^{FA}, muestras y sustrato fueron determinadas empíricamente.

El método utilizado fue el descrito en Clark y Adams (1977).

II.2.14.Detección de las proteínas de cubierta virales mediante Western Blot

Las muestras de hojas de plantas infectadas con los distintos virus se separaron en geles de poliacrilamida-SDS en cubetas "Mini Protean II" de Bio-Rad según el método descrito por Laemmli (1970). Las proteínas eran desnaturalizadas diluyéndolas en tampón disociador (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 4% de β mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.02% azul de bromofenol) y calentándolas 5 minutos a 95°C antes de ser cargadas en el gel. Los geles empleados tenían una zona de concentración de la muestra con 4,5% de poliacrilamida y una zona de separación del 17% de poliacrilamida cuando se trataba de proteínas virales.

La electroforesis se realizó a 15 mA por gel hasta que la muestra pasaba del gel de concentración al gel de separación, y 20 mA por gel el resto de la electroforesis.

II.2.15.Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa o de PVDF

Las proteínas separadas en los geles desnaturalizantes de poliacrilamida se transfirieron a filtros de nitrocelulosa o de PVDF (Amersham) con el sistema "Mini Trans-Blot" de Bio-Rad. La transferencia se realizó en tampón Tris-glicina-metanol (Tris 25 mM, glicina 190 mM, pH 8.3, 20 % metanol) a 250 mA durante 1 hora 30 minutos (Tobwin *et al.*, 1979).

II.2.16.Inmunodetección de proteínas sobre filtros

Para la detección de las proteínas transferidas se utilizaron los inmunosueros detallados anteriormente a una dilución de 1/10000 para PMMoV-S y PMMoV-I, 1/2000 para PaMMV y 1/300 para PVX. Posteriormente se incubaron las membranas con anticuerpos marcados con peroxidasa anti IgG de conejo (Nordick) o anti IgG de cabra (Boehringer), dependiendo del origen del inmunosero utilizado anteriormente. La actividad de la peroxidasa ligada al anticuerpo se detectó por el sistema de quimioluminiscencia ECL de Amersham.

II.2.17.Preparación de ARN total de la planta

La preparación del ARN total de plantas se realizó mediante el método de Logeman *et al.* (1987). Las muestras de tejido vegetal de hojas inoculadas con los distintos virus y de hojas superiores no inoculadas se recogieron entre 1 y 7 d.p.i. para los análisis por Northern Blot y a los 7 y 15 d.p.i. para la detección de las secuencias de las CP de los tobamovirus mediante PCR. Las hojas fueron trituradas en tampón guanidina (8M hidrocloreuro de guanidina, 20 mM MES, 20 mM EDTA, 50 mM β mercaptoetanol, pH 7.0) en la proporción de 1 ml/gr de tejido seguido de una extracción v/v con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugación durante 5' a 7500 r.p.m. en un rotor SS34 en centrífuga Sorval o a 13.000 r.p.m. en una microcentrífuga. Se recogió la fase acuosa y los ARN fueron precipitados añadiendo 0.2 volúmenes de ácido acético 1M pH 4.8 y 0.7 volúmenes de etanol 100% e incubando durante 20 min a -20°C. Tras una nueva centrifugación durante 20 minutos a 7500 r.p.m. en un rotor SS34 en centrífuga Sorval o a 13.000 r.p.m. en una microcentrífuga el ARN fue lavado con etanol al 70%, secado a vacío y resuspendido en H₂O estéril. Tras su extracción se determinó su concentración, se conservó y se guardó a -80°C.

La cuantificación de ARN se realizó espectrofotométricamente considerando un coeficiente de $E_{260\ 0.1\%}=25$ (Kaper y Geelen, 1971).

II.2.18.Detección por RT-PCR de las secuencias de las proteínas de cubierta de los tobamovirus

La detección de las secuencias de las proteínas de cubierta virales de los tobamovirus en las muestras de ARN total de plantas se realizó mediante la técnica de RT-PCR. En esta técnica el ARN viral sirve como molde para la síntesis de la cadena complementaria mediante una reacción de transcripción reversa (RT) catalizada por la enzima AMLV retrotranscriptasa (Promega). La reacción se incubó a 42°C durante 45 minutos en un volumen final de 20 μ l en tampón 50 mM Tris-HCl (pH 8.9), 50 mM ClK, 7.5 mM Cl₂Mg, 0.125 μ M de cada uno de los desoxinucleótidos, 0.1 μ M del cebador correspondiente en cada caso y 1 unidad de la enzima AMV-RT.

Una vez sintetizadas las hebras de cADN se procedió a realizar la reacción de PCR, en un volumen final de entre 25 y 100 μ L que contenían: 20 μ l de la reacción en

la que se encuentra el ADN molde, 2.5 unidades de Amplitaq (Perkin Elmer), los cebadores correspondientes a una concentración 1 μ M, 250 μ M de la mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.25 mM $MgCl_2$, y el tampón de la reacción compuesto por Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), 50 mM KCl. Las temperaturas y el número de ciclos se determinaron según la longitud del fragmento a amplificar y la estabilidad al apareamiento de los cebadores. Se utilizó un termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 2400).

Para la amplificación de la CP de PaMMV los cebadores utilizados fueron el CPPa3' para la reacción de RT y la pareja CPPa5' y CPPa3' para la reacción de PCR. El programa de ciclos seguido fue de 5 min a 92°C, 25 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 92°C, 30 seg de hibridación a 56°C y 1 min de polimerización a 72°C, con un último ciclo de 10 min a 72°C.

Para la amplificación de la CP de PMMoV los cebadores utilizados fueron el CP2 para la reacción de RT y la pareja CP1 y CP2 para la reacción de PCR. El programa de ciclos seguido fue de 5 min a 92°C, 25 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 92°C, 30 seg de hibridación a 56°C y 1 min de polimerización a 72°C, con un último ciclo de 10 min a 72°C.

Un volumen de 1/10 de la reacción se analizó por electroforesis en geles de agarosa. La banda amplificada en el caso de PaMMV fue de 590 bp y en el caso de PMMoV fue de 395 bp.

II.2.19.Extracción y cuantificación de proteínas para el análisis de PRs en plantas del género *Capsicum*

Las proteínas PRs fueron extraídas según el método de Tobias *et al.* (1989). Plantas de *C.frutescens*, *C.chinense* y *C.chacoense* fueron inoculadas con los virus PaMMV, PMMoV-S y PMMoV-I respectivamente a una concentración de 40 μ g/ml y con sus correspondientes virus quimera PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI en las condiciones indicadas en el apartado II.2.12. Como control todos los huéspedes se inocularon con el virus vector PVX vacío. Las hojas inoculadas y las hojas superiores no inoculadas se trituraron en mortero con N_2 líquido añadiendo 1 ml de tampón de extracción (100 mM ácido cítrico, 200 mM PO_4Hna_2 , 0.3% β -mercaptoetanol, 0.1% ácido ascórbico, 0.1% PVP, pH 2,8) por cada gramo de tejido fresco. El

homogeneizado se centrifugó a 20.000 g durante 20 minutos y el sobrenadante se dializó frente a tampón Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 a 4°C durante 24 horas, con tres cambios de tampón.

La cantidad total de proteínas extraída se cuantificó por el método de Bradford utilizando seroalbúmina bovina como patrón (Bradford, 1976).

II.2.20.Detección de proteínas PR1 en plantas del género *Capsicum*

Muestras de 5 µg de proteínas totales extraídas por el método anteriormente descrito se disolvieron en 15 µl de tampón disociador de proteínas (Laemmli, 1970) , se desnaturalizaron por calentamiento a 95°C y se separaron por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) . La electroforesis y la transferencia a filtros de nitrocelulosa o PVDF se realizaron como se ha detallado en el apartado II.2.14..

La detección de proteínas PR del grupo 1 se realizó utilizando el inmunosuero específico de la PR p14 de tomate a una dilución de 1/400.

II.2.21.Transfección de plantas del género *Capsicum* por el método biolístico

Para la transfección de ADN en plantas del género *Capsicum* se utilizaron plantas de 6-8 semanas de *C.frutescens*, *C.chinense* y *C.chacoense* crecidas *in vitro* como se indica en el apartado II.2.3. de materiales y métodos. Las hojas de dichas plantas fueron cortadas y colocadas sobre medio MS en placas Petri de 10 cm de diámetro.

La preparación de los microproyectiles y la precipitación del ADN sobre éstos se realizó por el método de Klein *et al.* (1988). La transfección de hojas por este método se realizó en un aparato PDS-1000/He de Bio-Rad. Los microproyectiles, bolas de oro de 1 µm de diámetro recubiertos por moléculas de ADN, se disparaban a través de discos de ruptura de 1200 psi sobre las placas que contenían las hojas cortadas.

Para la transfección de ADN se utilizaron plantas de *C.frutescens* se utilizaron microproyectiles recubiertos con las siguientes combinaciones de plásmidos:

pMJD82 (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)

pMJD-CPPa (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)
pMJD-CPS (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)
pMJD82 (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)
pMJD-CPPa (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)
pMJD-CPS (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)

Hojas de plantas de *C.chinense* cultivadas en las mismas condiciones que las anteriores se transfectoron con microproyectiles cubiertos con las siguientes combinaciones de ADN:

pMJD82 (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)
pMJD-CPS (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)
pMJD-CPI (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)
pMJD82 (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)
pMJD-CPS (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)
pMJD-CPI (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)

Hojas de plantas de *C.chacoense* cultivadas en las mismas condiciones que las anteriores se transfectoron con microproyectiles cubiertos con las siguientes combinaciones de ADN:

pMJD82 (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)
pMJD-CPS (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)
pMJD82 (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)
pMJD-CPS (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)

Se dispararon dos tandas de microproyectiles sobre cada una de las placas. Una vez realizados las hojas se transfirieron a placas Petri sobre papel de filtro húmedo y se mantuvieron en las mismas condiciones de las plantas cultivadas *in vitro* entre 8 horas y 4 días post bombardeo dependiendo del momento en el que se analizaron.

II.2.22. Análisis de la actividad β-glucuronidasa

En las hojas transfectadas se analizó la actividad GUS a 8, 16, 24 y 4 d.p.b. por el método de Jefferson et al. (1987). Para ello el tejido vegetal se cubrió con la solución que contiene el sustrato (100 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM de

ferrocianuro potásico y 2 mM de ácido 5-Bromo 4-Cloro-3-Indol β -D-glucurónico (X-Gluc)). Se infiltró a vacío y se incubó a 37°C durante 16 horas. Como resultado de la hidrólisis del X-Gluc por la β -glucuronidasa aparece el compuesto dicloro-dibromoindigo, producto de color azul que permite la localización de la actividad enzimática. Tras dos lavados de 10' en tampón 100 mM Tris pH 7.0 para parar la reacción el tejido se fijó en glutaraldehído al 1% diluido en 100 mM Tris-HCL pH 7.5. Para visualizar la tinción azul de la actividad GUS el tejido se clarificó por sucesivos lavados en una serie de etanol. Por último se rehidrató el tejido invirtiendo las series de etanol y se conservó sumergido en tampón en 100 mM Tris-HCl pH 7.5 o en etanol del 70%. La actividad GUS fue observada en las hojas mediante un estereomicroscopio ZEIS.

II.2.23. Análisis de ARN por el método "Northern"

Los ARN totales de hojas inoculadas de plantas de *C. chinense* infectadas con las cepas S e I del virus PMMoV se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% preparado con 6% formaldehído en tampón MOPS (40 mM MOPS, 10 mM acetato sódico, 1 mM EDTA, pH 7.0). 10 μ g de ARN de las distintas muestras se diluyeron hasta un volumen de 10 μ l con agua a los que se añadieron 12.5 μ l de formamida desionizada, 4 μ l de formaldehído al 33% y 2.5 μ l de MOPS 10x. Las muestras se calentaron a 65°C durante 10 minutos y se les añadió 2.5 μ l del tampón de muestra. La electroforesis se realizó a 50 voltios durante 1 hora y a 70 voltios durante las restantes 3 horas.

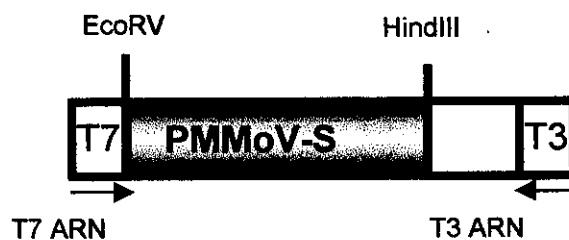
La transferencia de ARN a membranas de nylon se realizó según el protocolo descrito en Sambrook *et al.* (1989). El ARN se transfirió por capilaridad a la membrana de nylon y se fijó en un "UV crosslinker" de Stratalinker con 120.000 μ J de energía UV.

Las muestras de ARN transferidas a membranas fueron prehibridadas durante 1 hora a 65°C en una solución que contenía 6x y 5x solución Denhardt (0.5% SDS, 100 μ g/ml ADN de esperma de salmón, 50% formamida). Posteriormente se añadió la sonda marcada con 32 P y se incubó 16 h a 65°C. Las membranas se lavaron cuatro veces con una solución 2x SSC, 0.1% SDS a 65°C y una vez más con una solución 1x SSC y 0.1% SDS a 65°C.

El revelado se hizo por exposición de las membranas a películas autorradiográficas (kodak X-OMAT-AR).

II.2.24.Marcaje de ácidos nucleicos

La sonda utilizada para la detección de los ARN virales de las cepas S e I PMMoV fue una sonda de ARN que se transcribió a partir del clon pT3T7-CPS (plásmido pT3T7 y la secuencia de la proteína de cubierta de PMMoV-S) con las enzimas ARN T7 polimerasa (Boehringer) o ARN T3 polimerasa (Boehringer) dependiendo de si las cadenas que se iban a detectar en las membranas de nylon eran respectivamente las positivas o las negativas del virus. Para realizar el marcaje el plásmido pT-CPS fue digerido con la enzima Hind III para que sirviera como molde en la transcripción en la que realizó el marcaje para la detección de las cadenas positivas y con la enzima EcoRI para la detección de las cadenas negativas. Una vez realizado el marcaje de la sonda se realizaba un conteo de la radiactividad incorporada.



II.2.25.Detección de especies reactivas de oxígeno

La determinación de la producción de anión superóxido (O_2^-) se realizó por el método descrito en Doke (1983). Este método se basa en la capacidad que tienen los aniones superóxido de reducir el compuesto "nitroblue tetrazolium" (NBT).

Plantas de *C.chinense* fueron inoculadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de las cepas española e italiana de PMMoV y con tampón. Se recogieron muestras de cinco discos de hoja de uno 8 mm de diámetro cada uno, de diferentes hojas inoculadas tanto de las plantas inoculadas con los virus como con de los controles inoculados con tampón a los siguientes tiempos: cada hora desde 1 hasta 12 h.p.i., y a partir de este tiempo a las 14, 16, 24, 36, 48 y 72 h.p.i.. Las muestras se sumergieron e incubaron durante 1 hora en una solución de 0.05% NBT y 10 mM NaN_3 en tampón fosfato pH 7.8. La mezcla se calentó a 85°C durante 15 minutos y se enfrió en hielo rápidamente. La actividad de

los discos para reducir NBT fue expresada como incremento de absorbancia a 580 nm en 1 hora por 100 mg de tejido fresco. En las muestras de plantas inoculadas con los virus se refería a la actividad de las plantas inoculadas con tampón, considerándose esta actividad con un valor absoluto de 1. Todas las muestras se recogieron por duplicado.

La determinación de la producción de H_2O_2 se realizó por el método descrito en Tiedemann (1997) basado en la actividad de una peroxidasa comercial (Sigma) para degradar las moléculas de agua oxigenada presentes en las muestras vegetales. Para realizar estos experimentos se inocularon plantas de *C.chinense* con 50 $\mu\text{g/ml}$ de las cepas española e italiana de PMMoV y con tampón y se recogieron muestras de cinco discos de hojas inoculadas de 8 mm cada uno que se sumergieron e incubaron en 2 ml de una mezcla de reacción que contenía 0.05% guayacol y 5 unidades de peroxidasa de rábano (Sigma) en tampón fosfato 50 mM pH 7.0. La mezcla se incubó 2 horas a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Se determinó a una absorbancia de 450 nm y los valores obtenidos eran expresados como $\text{nmol } H_2O_2/100 \text{ mg de tejido fresco}$. Los resultados obtenidos en las planta sinoculadas con ambos virus fueron referidos a los valores obtenidos en cada tiempo en las muestras inoculadas con tampón y a las que se dio el valor de 1. Todas las muestras se recogieron por duplicado.

II.2.26.Detección de callosa

Plantas de *C.chinense* fueron inoculadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de las cepas española e italiana de PMMoV y con tampón. Las muestras de cada una de las plantas, dos discos de 8 mm de diferentes HI se recogieron adistintos tiempos postinoculación. Las muestras fueron hervidas en una mezcla de fenol-ácido láctico (1:1) durante dos minutos y posteriormente se tiñeron durante 30 minutos en una solución acuosa de anilina azul al 0.05 % en tampón fosfato potásico 0.067M pH 5.8. Las muestras se prepararon en la solución de anilina y se observaron en un microscopio ZEIS por epifluorescencia ultravioleta. Todas las muestras se recogieron por duplicado.

II.2.27.Detección de autofluorescencia en zonas necrosadas

Plantas de *C.chinense* fueron inoculadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de las cepas española e italiana de PMMoV y con tampón. Se recogieron muestras a distintos tiempos postinoculación de plantas de dos discos de 8 mm de diferentes HI. Las muestras

fueron hervidas en una mezcla de fenol-ácido láctico (1:1) durante dos minutos. Posteriormente se lavaron sucesivamente en etanol al 50% y agua, y se prepararon para su observación en una solución de glicerol al 50%. La autofluorescencia se visualizó en un microscopio ZEIS por epifluorescencia ultravioleta.

II.2.28. Cuantificación de la muerte celular

Plantas de *C. chinense* fueron inoculadas con 50 µg/ml de las cepas española e italiana de PMMoV y con tampón. Las muestras de hojas inoculadas se recogieron a distintos tiempos post inoculación y fueron tratadas según el método de Tuner y Novacky (1974). Cuatro discos de hojas diferentes de unos 8 mm de diámetro y se recogían por duplicado. Las muestras se sumergieron en 1 ml de la solución acuosa del colorante Evans Blue al 0.25% y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en agua destilada y el colorante acumulado en las hojas se eluyó en una solución acuosa de metanol al 20% y SDS al 1%. Se midieron a una absorbancia 600 nm y la muerte celular se cuantificó como un incremento de la misma a esta longitud de onda siempre referida a un valor de 1 que era el que alcanzaban las muestras inoculadas con tampón.

Análisis de ARN diferenciales por RT-PCR

Para los ensayos de ARNs diferenciales las muestras de HI se procesaron como se ha indicado en el apartado . Para la eliminación completa de ADN las muestras se trataron primero con proteinasa K para eliminar las posibles ARNasas y la posible degradación del ARN cuando se incubaran a 37°C con la ADNasa.

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo acorde con las instrucciones del "kit" . Para generar la primera hebra de cADN se mezclaron 0.2 µg de ARN libre de DNA (0.1 µg/µl), 2 µl del cebador de anclaje (T₁₂AT y T₁₂CT), 1.6 µl dNTP (250 µM), 4 µl buffer de la transcriptasa reversa (125 mM Tris-HCl, pH 8.3, 188 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂, 25 mM DTT) y dH₂O hasta completar un volumen final de 19 µl. Después de incubar la muestra 1 minuto a 37°C se añadió 1 µl de la enzima MMLV transcriptasa reversa. El ciclo de tiempos y temperaturas a los que se incubaron las muestras fueron los siguientes: 65°C 5min 37°C 60 min 95°C 5 min.

La reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl compuesto por 2 µl de la mezcla de reacción anterior, 2 µl de buffer de la Taq polimerasa (100 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatina), 1.6 µl dNTP (25 µM), 2 µl del cebador de anclaje anteriormente utilizado, 2 µl de

cebador arbitrario (AP1, AP2, AP3, AP46 AP5) (2 μ M), 1 μ l α^{35} S-dATP (1200 Ci/nmol) y 1 unidad de la enzima Ampli TAQ polimerasa (Perkin Elmer). Las reacciones se llevaron a cabo conforme a los siguientes ciclos: 40 ciclos de 94°C 30 seg. 40°C 2 min 72°C 30 seg. y un ciclo final 72°C 5 min.

Todas las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer. Los fragmentos amplificados se separaron en un gel de acrilamida 6% en tampón TBE. Antes de cargar las muestras se les añadieron 2 μ l de tampón de carga y se corrieron en el gel durante 3.5 horas a una intensidad de corriente constante de 60 vatios. Una vez finalizada la electroforesis el gel se secó sobre un papel Whatman 3MM y fue revelado por autorradiografía. Una vez visualizadas las bandas y localizadas las de interés se procedió a su elución del gel.

Para eluir las bandas se cortan aquellas consideradas de interés y se introducen en un tubo eppendorf. Se añaden 100 μ l de dH_2O y se deja 10 minutos a temperatura ambiente. Se hierva el tubo durante 15 minutos y se centrifuga a 13.000 r.p.m. en una microcentrífuga. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se añaden 10 μ l de acetato sódico 3M pH 5.3, 5 μ l de glucógeno (10 mg/ml) y 450 μ l de etanol absoluto. Se deja 30 minutos a -80°C. Se centrifuga 10 minutos a 13.000 r.p.m. en una microcentrífuga a 4°C para precipitar el ADN. Se lava el ADN con etanol al 85% y se seca.

Una vez eluidos los fragmentos se procedió a la generación de extremos romos en los mismos con la enzima Klenow y se procedió a su clonación en el vector pT3T7 digerido con la enzima HindII. Una vez obtenidos los diferentes clones de cada uno de los fragmentos diferenciales se procedió a su secuenciación. Una vez obtenidas estas secuencias se compararon en un banco de datos para determinar si correspondían a secuencias conocidas.

RESULTADOS

III.1. ESTUDIO DE LOS INDUCTORES VIRALES DE LA RESISTENCIA CONFERIDA POR LOS GENES L EN EL GÉNERO *Capsicum*.

Como ya se ha señalado anteriormente en el género *Capsicum*, la resistencia frente a tobamovirus es conferida por cuatro genes alélicos en el locus *L* ($L^1 - L^4$) con un incremento en la efectividad frente a los miembros de los tobamovirus (Boukema *et al.* 1980, Boukema 1982.). Estos virus se han agrupado en patotipos, que se han designado como P_0 , P_1 , $P_{1,2}$ y $P_{1,2,3}$, según su capacidad para sobrepasar la resistencia de los genes L^1 , L^2 , L^3 y L^4 . Para identificar los inductores de la resistencia de esta serie alélica frente a tobamovirus se clonaron las CP de PaMMV (patotipo P_1), PMMoV-S (patotipo $P_{1,2}$) y PMMoV-I (patotipo $P_{1,2,3}$) en los vectores de expresión transitoria en plantas y se estudió su interacción con los genes *L* en plantas de *C. frutescens* (L^2L^2), *C. chinense* (L^3L^3) y *C. Chacoense* (L^4L^4).

III.1.1. Clonaje de las proteínas de cubierta de los virus PaMMV, PMMoV-S y PMMoV-I en el vector pPC2S

En las figuras 1,2 y 3 se muestran los esquemas del clonaje de las proteínas de cubierta de los tobamovirus estudiados en el vector de expresión en plantas pPC2S. El clonaje se realizó tal y como se indica en los apartados II.2.9.1., II.2.9.2. y II.2.9.3. en el apartado de materiales y métodos.

En los clones resultantes pPVX-CPPa, pPVX-CPS y pPVX-CPI, las proteínas de cubierta se expresan bajo la acción del promotor de la CP de PVX. En la estrategia de clonación de todas ellas se han conservado dos pautas en común. No existe ningún nucleótido por delante del ATG inicial de las secuencias de las CPs de los tobamovirus y en todas ellas se ha conservado parte del extremo 3' no codificador (83 bp en la secuencia de la CP de PaMMV, 120 bp en la secuencia de PMMoV-S y de la secuencia de PMMoV-I).

III.1.2. Infectividad y acumulación de los virus quimera en plantas del género *Nicotiana*

La infectividad de los ARNs transcritos derivados de los plásmidos pPVX-CPPa, pPVX-CPS y pPVX-CPI se ensayó en plantas de *N. benthamiana* y *N. sylvestris*.

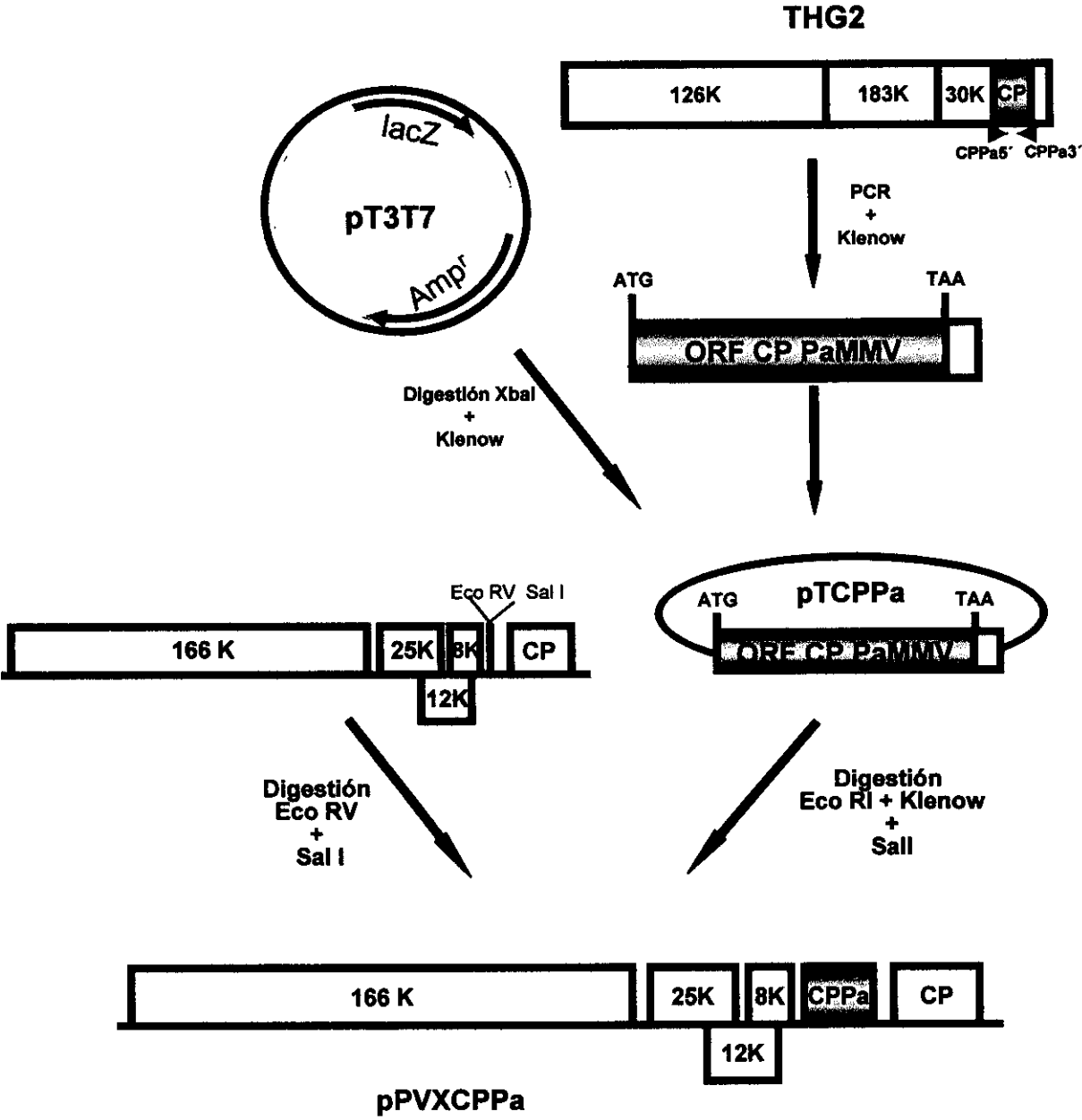


Figura 1. Representación esquemática de la estrategia de clonaje del gen de la proteína de cubierta de PaMMV en el vector de expresión en plantas pPC2S.

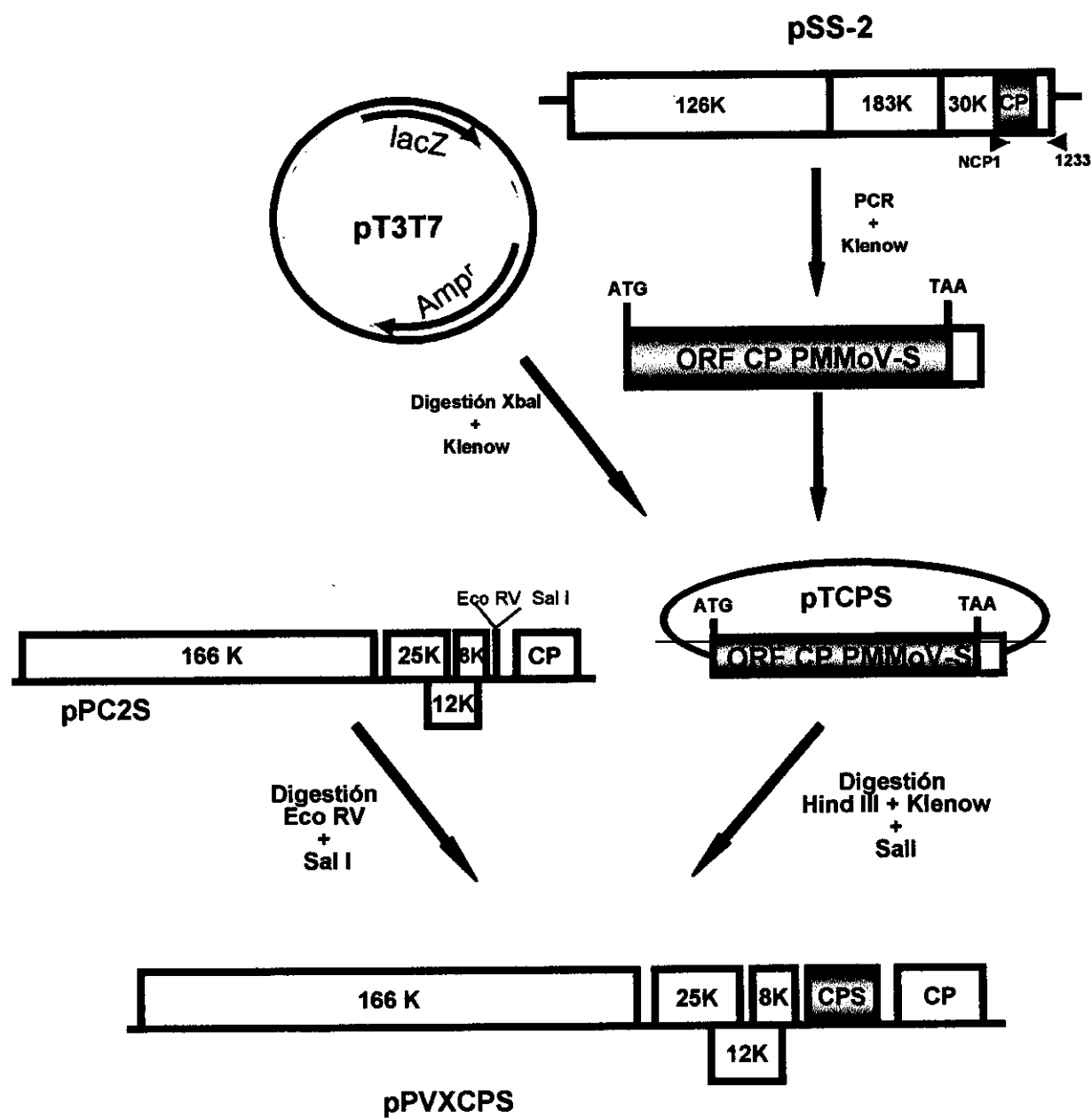


Figura 2. Representación esquemática de la estrategia de clonaje de la CP de PMMoV-S en el vector de expresión en plantas pPC2S.

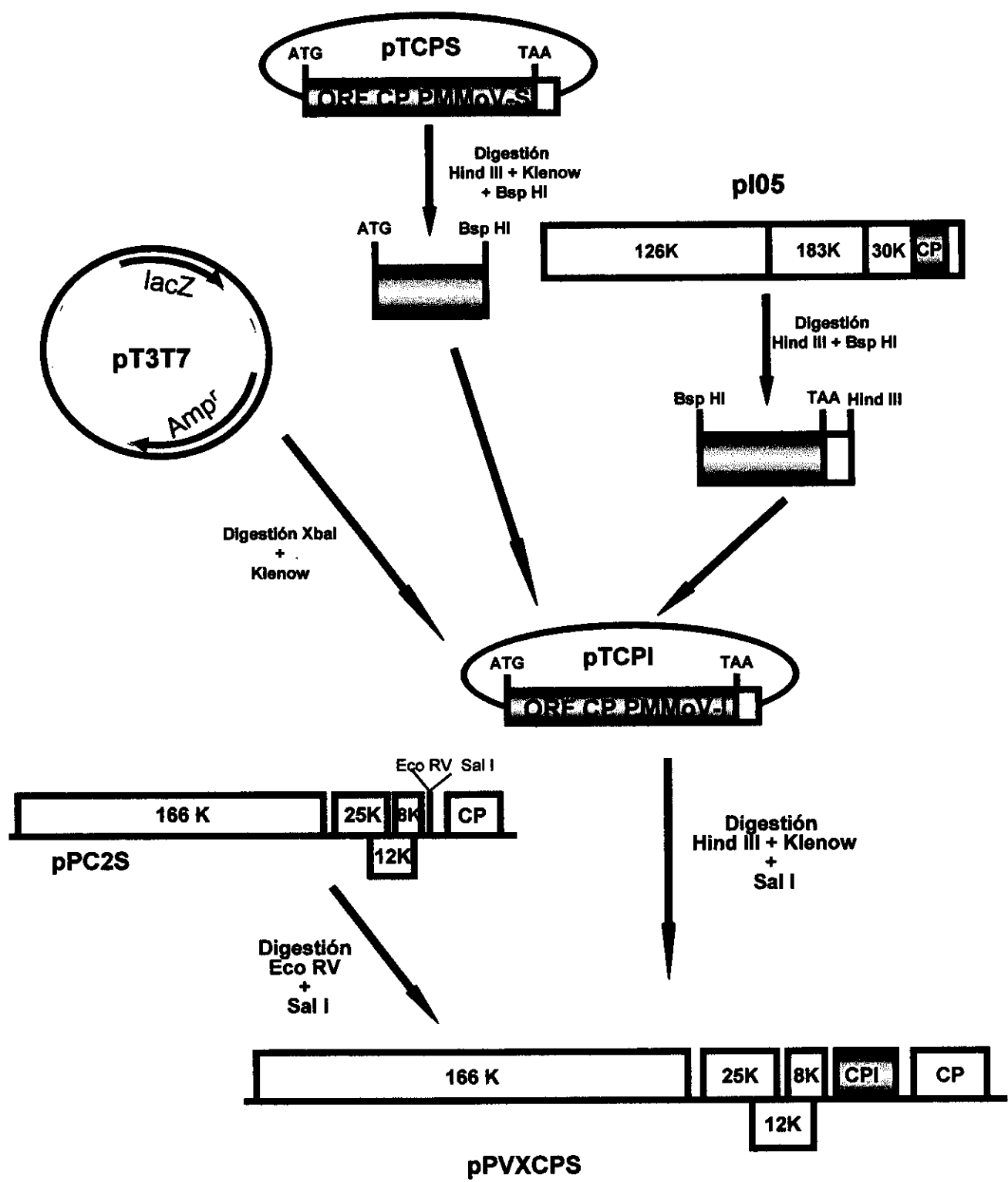


Figura 3. Representación esquemática de la estrategia de clonaje de la CP híbrida entre la CP de PMMoV-S y la CP de PMMoV-I, denominada CPI, en el vector de expresión en plantas pPC2S.

En *N. benthamiana* se produjo una infección sistémica tanto con los transcritos quiméricos como con el transcrito derivado del plásmido pPC2S. Los síntomas observados fueron semejantes en todos los casos.

La acumulación de las proteínas de la cápsida de PVX y de las CP de los distintos tobamovirus expresadas a partir de los distintos virus quimera fue determinada por ELISA-DAS y Western Blot a distintos tiempos post inoculación, tanto en HI como en HS. Como se muestra en la tabla y/o figura en las HS no inoculadas la mejor relación entre la CP del vector PVX y la CP de los tobamovirus se observó a los 5 d.p.i. Este tiempo se seleccionó para la obtención de inóculo para los posteriores ensayos.

El gen N' de *Nicotiana sylvestris* confiere resistencia frente a todas las cepas de TMV excepto frente a la cepa U1. Los mutantes U1 capaces de infectar sistémicamente se diferencian de las cepas de TMV, que se quedan localizadas en las HI, en una sustitución aminoacídica en la CP (Knorr y Dawson, 1988; Culver y Dawson, 1989), y posteriormente se determinó que la CP era el inductor viral de la resistencia en plantas de *N. sylvestris* (Culver y Dawson, 1991).

La infección de plantas de *N. sylvestris* por las cepas pimienta de los tobamovirus genera también la aparición de una HR en forma de LLN a los 3-4 d.p.i.. Por ello se utilizó este huésped para analizar la infectividad de los virus quimeras PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI y para comparar el fenotipo de las lesiones producidas con el inducido con los virus PMMaV, PMMoV-S y PMMoV-I. Los virus quimeras junto con PVX, se inocularon a partir de savia de plantas de *N. benthamiana* que habían sido infectadas con los transcritos virales. Como controles de la infección y aparición de síntomas se inocularon plantas con los virus salvajes PaMMV (50 µg/ml), PMMoV-S (50 µg/ml) y PMMoV-I (50 µg/ml).

A los 4 d.p.i. se observó la inducción de LLN tanto en las plantas inoculadas con los virus quimeras como en las inoculadas con los tobamovirus. Las lesiones necróticas formadas por los tobamovirus eran semejantes a las de los virus derivados con el correspondiente inserto de la CP (figura 4). En las plantas inoculadas con el virus PVX no hubo aparición de necrosis en las HI aunque sí se observaron puntos cloróticos a lo largo de todo el tiempo que duró el experimento (figura 4). A los 15 d.p.i. no se observaron síntomas de clorosis o necrosis en las hojas superiores no inoculadas de ninguna de las plantas.

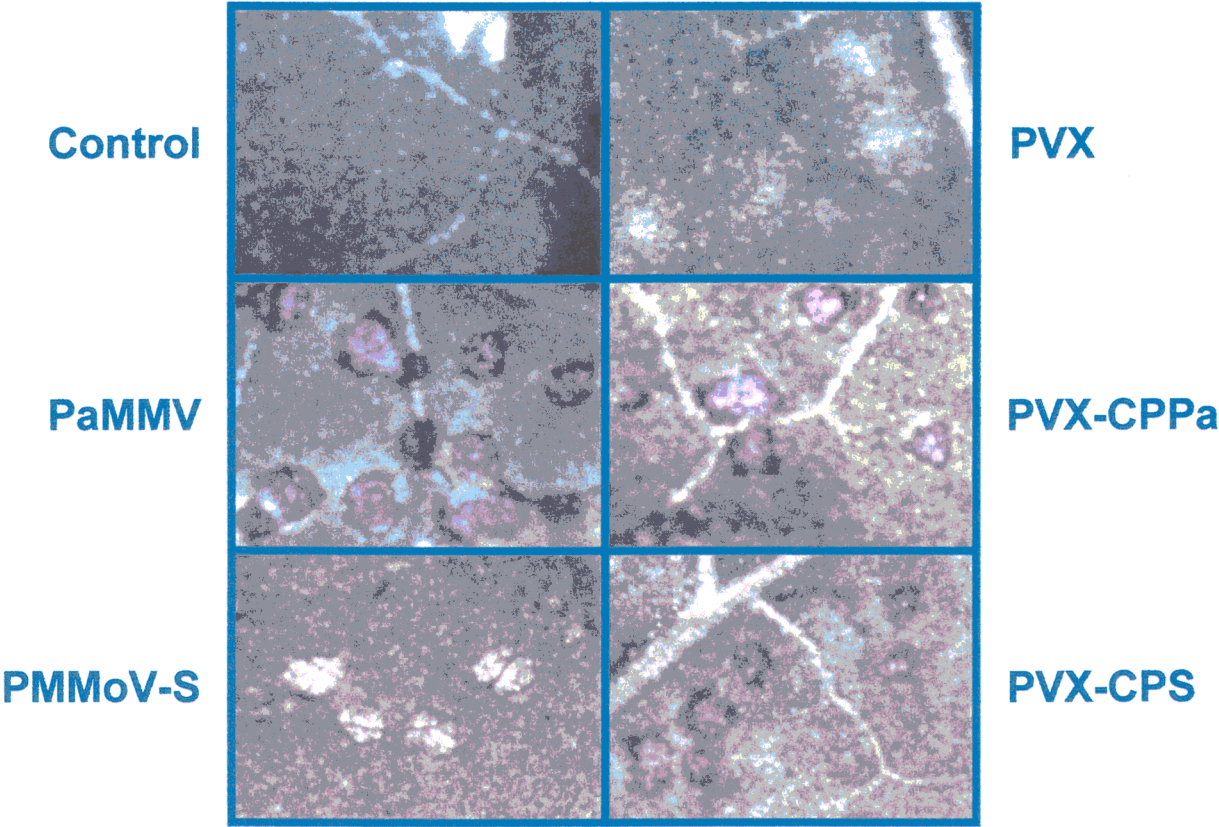


Figura 4. Sintomatología en hojas de plantas de *N. Sylvestris* a los 4-5 d.p.i. con los virus indicados en los márgenes de cada foto.

Se recogieron muestras de HI a los 5 d.p.i. y de HS a los 15 d.p.i. para analizar por Western blot la presencia/ausencia de la proteína de cubierta viral de los tobamovirus, y por RT-PCR para determinar la presencia/ausencia de la secuencia de dichas proteínas.

Como se observa en la figura 5 se detectaron las CPs virales en las HI tanto en las plantas inoculadas con los virus quimeras (PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI) como en las inoculadas con los tobamovirus (PaMMV, PMMoV-S, PMMoV-I). En las HS no inoculadas no se detectaron estas proteínas en ninguna de las muestras analizadas.

Una vez establecidas las condiciones de la infección y de síntomas en plantas de *N. benthamiana* y *N. sylvestris* se procedió a determinar si la proteína de la cápsida de los tobamovirus era el único factor viral necesario para la inducción de la resistencia conferida por los genes L^2 , L^3 y L^4 del género *Capsicum*.

III.1.3. Estudio de los inductores virales de la resistencia en plantas de *C. frutescens*.

En plantas de *C. frutescens* cv Tabasco (L^2L^2), el virus PaMMV induce la resistencia conferida por el gen L^2 , mientras que las cepas S e I de PMMoV, sobrepasan esta resistencia y producen una infección sistémica en este huésped.

Para determinar si la CP de PaMMV es el único factor viral requerido para la inducción de la resistencia conferida por este gen plantas de *C. frutescens* (L^2L^2) se inocularon con los virus quimeras PVX-CPPa, PVX-CPS, PVX-CPI y PVX, utilizando diferentes diluciones de inóculo procedentes de plantas de *N. benthamiana* inoculadas 5 días antes con las distintas construcciones.

En las plantas de *C. frutescens* inoculadas con el virus híbrido PVX-CPPa se observó la aparición de lesiones locales necróticas a los 4 días post inoculación (d.p.i.), periodo que fue semejante al observado para la inducción de LLN por el virus PaMMV en todos los casos ensayados. Sin embargo el fenotipo de las lesiones generadas en cada uno de los casos es algo diferente. En las plantas inoculadas con el virus PaMMV las lesiones son redondeadas y conservan un halo clorótico alrededor de la necrosis. En las hojas inoculadas con el virus quimera las lesiones son más irregulares, en general

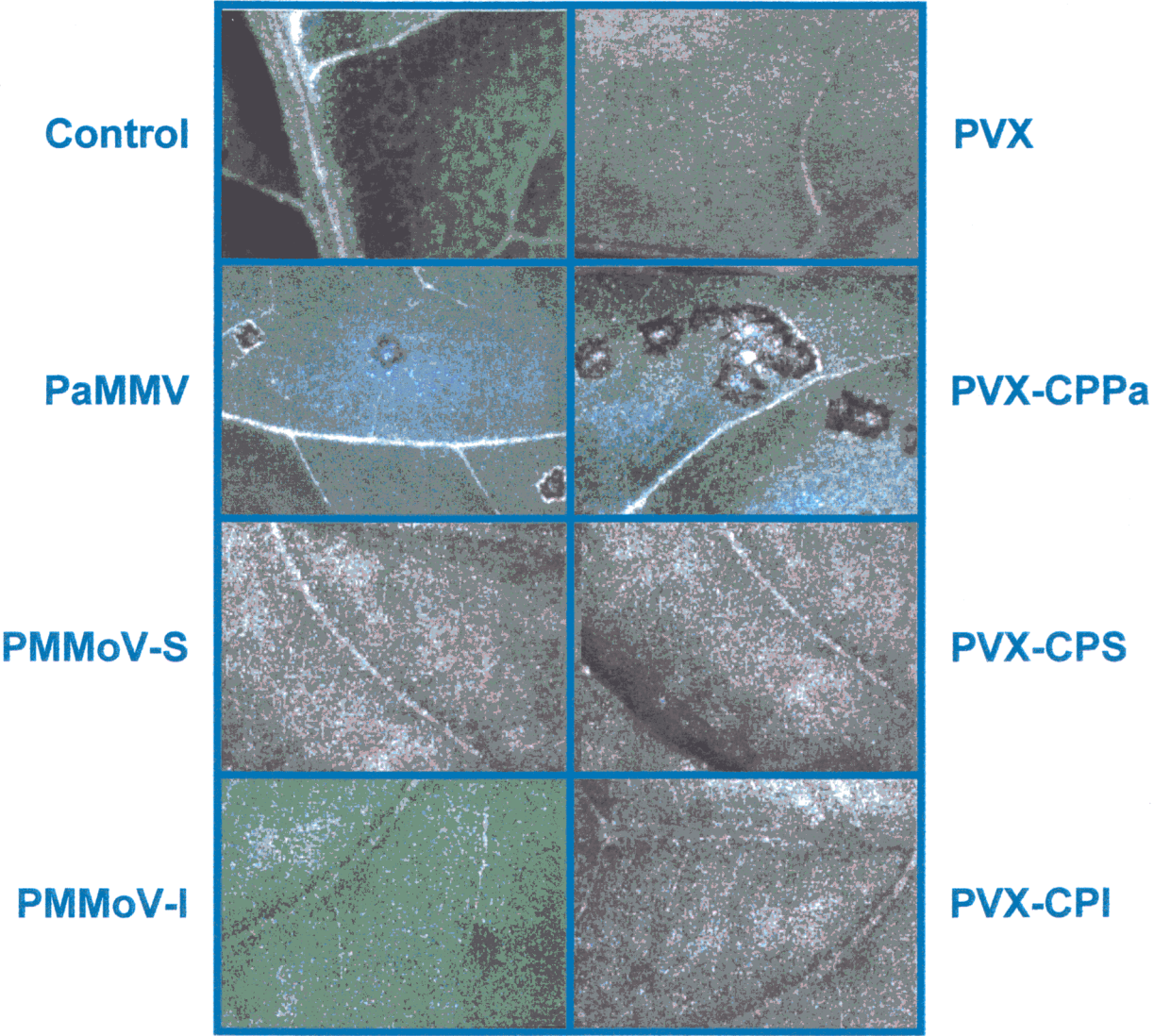


Figura 6. Sintomatología en hojas de plantas de *C. frutescens* a los 4-5 d.p.i. En las hojas inoculadas con los virus indicados en los márgenes de la figura.

son de mayor tamaño y no conservan ese halo clorótico que se genera cuando son infectadas con el virus inductor de la resistencia. En las plantas inoculadas con el vector PVX vacío no se observó ningún tipo de lesión a este tiempo post inoculación (figura 6).

En HS no inoculadas la sintomatología depende de la dosis de inóculo utilizada. A elevadas dosis de inóculo estas plantas muestran a los 15 d.p.i. síntomas de necrosis sistémica semejantes a los producidos cuando se inoculó el virus vector PVX vacío. Esta infección es debida a que para la generación de este virus vector (pPC2S) se duplicó el promotor de la proteína de cubierta del virus PVX (Chapman *et al.*, 1992). La inserción del inserto se produce entre ambas secuencias duplicadas. Esto hace que durante la infección del virus híbrido pueda existir una recombinación homóloga entre ambos promotores y se pierda el fragmento insertado. Sin embargo, cuando en el inóculo se mantenía una relación de 20-40 ng de proteína de cubierta de PaMMV por 1 µg de proteína de cubierta de PVX se indujo la reacción hipersensible y la formación de lesiones locales necróticas, y no se detectó infección de PVX en las HS. Como se observa en la tabla II las plantas que fueron inoculadas con el vector vacío muestran una necrosis generalizada a los 15 d.p.i., mientras que las plantas inoculadas con el virus quimera que contenía la CP de PaMMV no desarrollaron síntomas visibles y su aspecto fue similar al de las plantas que fueron inoculadas con tampón.

Se analizó la presencia/ausencia tanto de las secuencias de la CP de PaMMV como de las proteínas de cubierta de este virus y de PVX en las condiciones en las que no se produce la infección sistémica del virus vector vacío PVX en plantas inoculadas con el virus quimera, con el virus inductor PaMMV, con PVX y con tampón. Cuando se analizaron por RT-PCR y por ELISA-DAS y Western Blot muestras de HI a los 7 d.p.i. y de HS a los 15 d.p.i. sólo se detectaron las secuencias correspondientes a la CP de PaMMV y la proteína de este virus en las hojas inoculadas. En las HS no inoculadas no se detectó la secuencia ni la propia proteína de este virus en ninguna de las plantas que fueron inoculadas (figura 7, A y B).

Para determinar la especificidad de la interacción de la CP de PaMMV y el genotipo L²L² se inocularon plantas de este huésped con los virus quimera PVX-CPS y PVX-CPI. Como se observa en la tabla II durante los primeros estadios de la infección, tanto las plantas inoculadas con los virus quimera PVX-CPS y PVX-CPI, como las inoculadas con las cepas S e I de PMMoV, muestran un aspecto similar al de las plantas inoculadas con tampón, mientras que en las inoculadas con PVX se

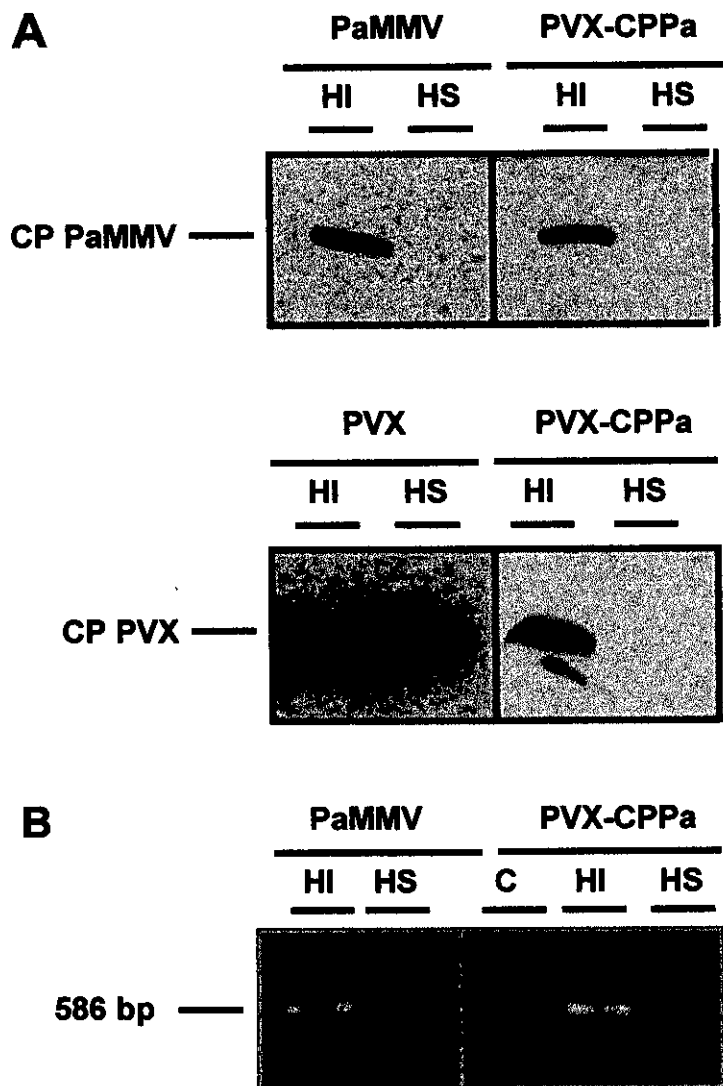


Figura 7. Detección de la secuencia y la CP de PaMMV y PVX en plantas de *C. frutescens* inoculadas con los virus PaMMV y PVX, y con el virus quimera PVX-CPPa.

(A) Detección de la CP de PaMMV (superior) y PVX (inferior) en plantas inoculadas con los virus indicados en cada una de las figuras en hojas inoculadas (HI) a los 5 d.p.i. Y en hojas superiores no inoculadas (HS) a los 15 d.p.i..

(B) Detección de la secuencia de la CP de PaMMV por RT-PCR en HI a los 5 d.p.i. y en HS a los 15 d.p.i.. Las plantas control (C) fueron inoculadas con tampón.

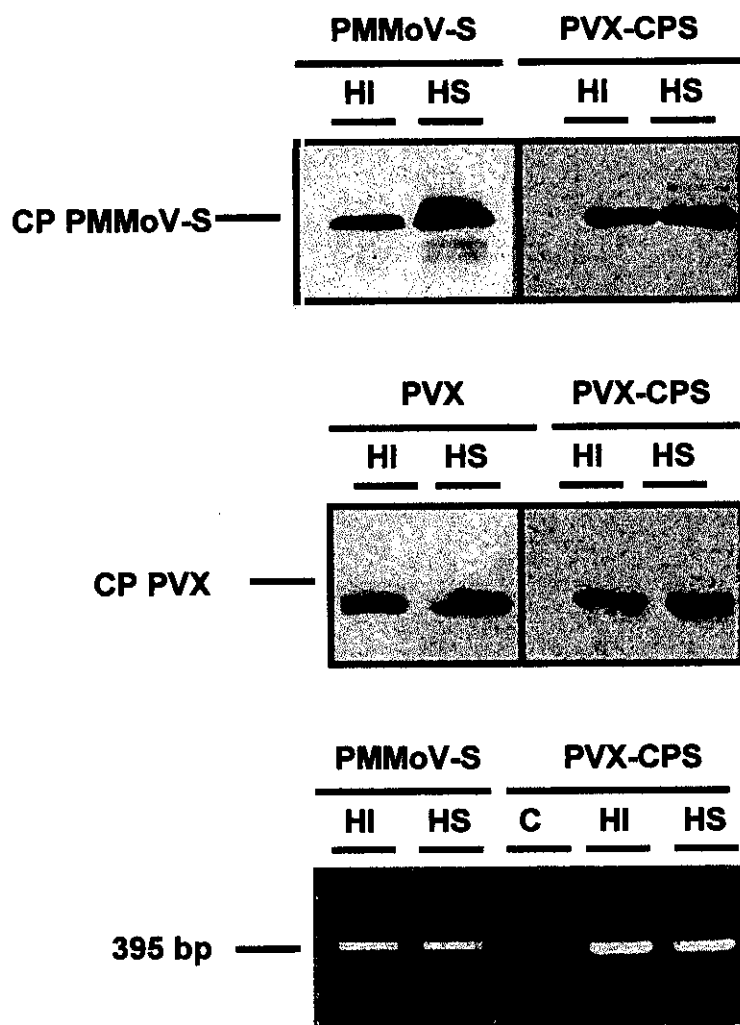


Figura 8. Detección de la secuencia y la CP de PMMoV-S y PVX en plantas de *C. frutescens* inoculadas con los virus PMMoV-S y PVX, y con el virus quimera PVX-CPS. (A) Detección de la CP de PMMoV-S (superior) y PVX (inferior) en plantas inoculadas con los virus indicados en cada una de las figuras en hojas inoculadas (HI) a los 5 d.p.i. Y en hojas superiores no inoculadas (HS) a los 15 d.p.i.. (B) Detección de la secuencia de la CP de PMMoV-S por RT-PCR en HI a los 5 d.p.i. y en HS a los 15 d.p.i.. Las plantas control (C) fueron inoculadas con tampón.

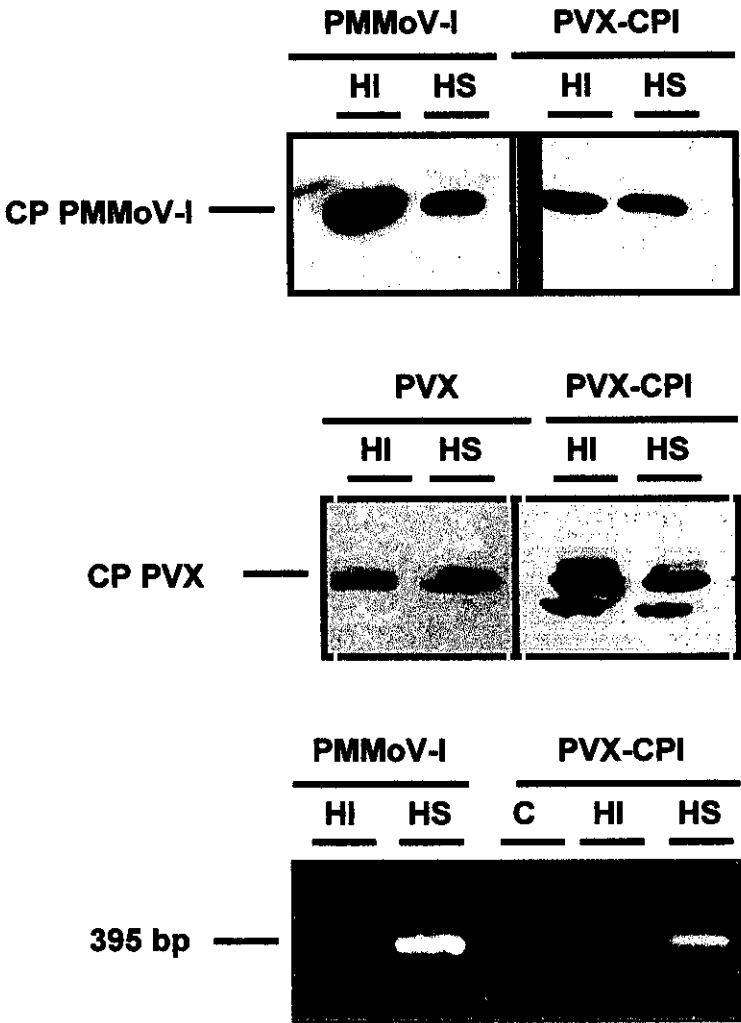


Figura 9. Detección de la secuencia y la CP de PaMMV y PVX en plantas de *C. frutescens* inoculadas con los virus PMMoV-I y PVX, y con el virus quimera PVX-CPI. (A) Detección de la CP de PMMoV-I (superior) y PVX (inferior) en plantas inoculadas con los virus indicados en cada una de las figuras en hojas inoculadas (HI) a los 5 d.p.i. Y en hojas superiores no inoculadas (HS) a los 15 d.p.i.. (B) Detección de la secuencia de la CP de PMMoV-I por RT-PCR en HI a los 5 d.p.i. y en HS a los 15 d.p.i.. Las plantas control (C) fueron inoculadas con tampón.

desarrollaron síntomas de necrosis sistémica. En ningún momento se observó aparición de lesiones necróticas en las hojas inoculadas. A los 10 d.p.i. las plantas inoculadas desarrollaron un mosaico suave en hojas superiores no inoculadas. A los 15 d.p.i. se observó una necrosis sistémica idéntica a la desarrollada en las plantas inoculadas con el virus vector vacío (Tabla II).

En las hojas inoculadas y superiores de estas plantas se analizó, a los 7 y a los 15 d.p.i. respectivamente, la acumulación de la proteína de cubierta de PVX, PMMoV-S y PMMoV-I tanto por Western blot como por ELISA-DAS. La acumulación de ambos virus quimera fue similar en hojas inoculadas y en las hojas superiores no inoculadas. Se detectó también la presencia de las secuencias de la CP de PMMoV-S y PMMoV-I mediante RT-PCR con los cebadores CP1 y CP2. Se amplificó un fragmento de cDNA de 395 b.p. correspondiente a la CP de PMMoV-s y PMMoV-I tanto en HI como en HS no inoculadas (figuras 8 y 9).

Tabla I. Inducción de síntomas en plantas de *C. frutescens* cv Tabasco inoculadas con los virus quimeras PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI, y con el virus PVX.

Síntomas desarrollados en plantas de <i>Capsicum frutescens</i> (L ² L ²)			
Virus	H.I. (5d.p.i.)	H.S. (10 d.p.i.)	H.S. (15 d.p.i.)
PVX	Asintomático	Mosaico	Necrosis
PVX-CPPa	LLN	Asintomático	Asintomático
PVX-CPS	Asintomático	Mosaico	Necrosis
PVX-CPI	Asintomático	Mosaico	Necrosis

III.1.3.1.Inducción de marcadores de resistencia por la proteína de cubierta de PaMMV

La inducción de la proteína relacionada con la patogénesis PR1 ha sido ampliamente descrita como un marcador de la resistencia hipersensible en distintos huéspedes (Van Loon, 1985; Ukness *et al.*, 1993). Para determinar si la CP del virus PaMMV además de ser el único factor viral requerido para la inducción de LLN, era también el inductor de marcadores asociados a la HR, se inocularon plantas de *C. frutescens* con el virus quimera PVX-CPPa y con los virus PaMMV y PVX.

Las HI y HS de estas plantas se analizaron por Western Blot utilizando un inmunosueros específico de la PR1b1 de tomate proteína cuya expresión se induce

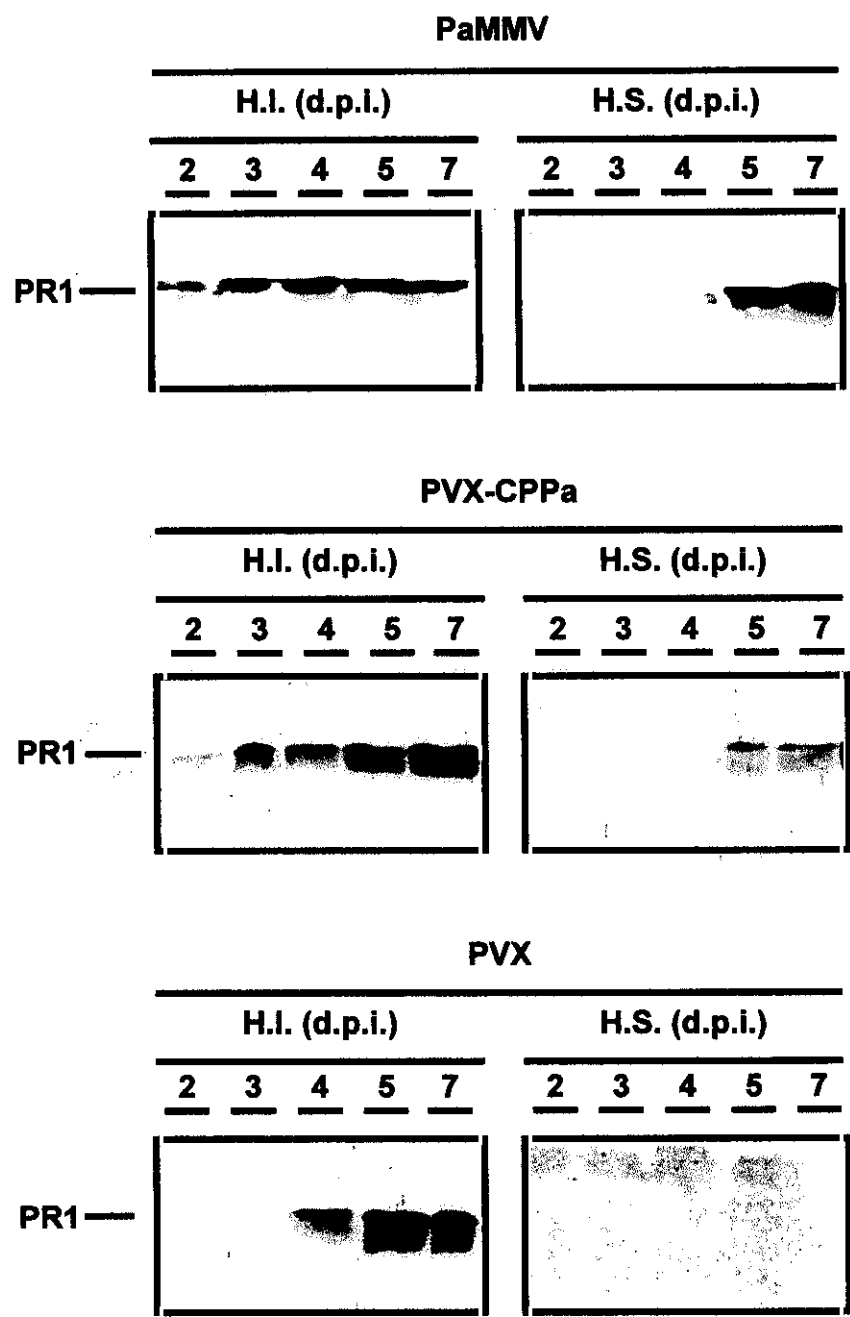


Figura 10. Detección de la proteína relacionada con la patogénesis PR1 en plantas de *C. frutescens* inoculadas con los virus PaMMV y PVX, y con el virus quimera PVX-CPPa, en hojas inoculadas (HI) y hojas superiores no inoculadas a los días post inoculación (d.p.i.) que se indican en cada carril.

por patógenos en plantas transgénicas de tabaco (Tornero *et al.*, 1997). Se observó que en las plantas que habían sido inoculadas con el virus PaMMV (figura 10) existía una inducción de la proteína PR1 desde los 2 d.p.i. hasta los 7 d.p.i. en HI. En HS la inducción se detectó a partir de los 4 d.p.i. (figura 10). En plantas inoculadas con el virus quimera PVX-CPPa se observó el mismo patrón de inducción que cuando se inoculaba PaMMV, tanto en HI como en HS. En plantas inoculadas con el virus PVX la inducción de esta proteína se produce sólo en HI y a tiempos más tardíos, a partir de los 4 d.p.i. En HS no se detecta esta proteína ni siquiera a los tiempos más largos que se han analizado.

De estos resultados se deduce que la CP de PaMMV es el único factor viral necesario para la inducción de la resistencia en plantas de *Capsicum* con el gen L^2 , y que esta interacción es específica ya que los virus quimeras que contenían las CP de PMMoV-S y PMMoV-I no indujeron la resistencia en este huésped.

III.1.3.2. Estudio de la inducción de la muerte celular y genes asociados a la resistencia en plantas de *C. frutescens*

Para determinar si la CP es el inductor viral de la respuesta de defensa fuera de todo contexto viral se expresó la secuencia de la CP de PaMMV y de PMMoV-S en plantas, mediante el vector pMJD82.

En las figuras 11 y 12 se muestra el esquema del procedimiento requerido para el clonaje de las CPs de PaMMV y PMMoV-S en el vector pMJD82.

Para el estudio plantas de *C. frutescens* cultivadas *in vitro* fueron transfectadas mediante una técnica de bombardeo con microproyectiles. Este sistema de expresión transitoria por métodos biolísticos se basa en la predicción de que la transfección de las células de *C. frutescens* con los plásmidos pMJD-CPPa y pMJD-CPGUS induciría de la muerte celular durante la HR e inhibiría por la expresión de la CP de PaMMV la expresión del gen de la β -glucuronidasa (GUS) que se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo en plantas. Así pues las partículas de oro con las que se transfectaron las hojas de *C. frutescens* se recubieron con las siguientes combinaciones de ADN:

pMJD82 (5 μ g) + pMJD-GUS (2.5 μ g)

pMJD-CPPa (5 μ g) + pMJD-GUS (2.5 μ g)

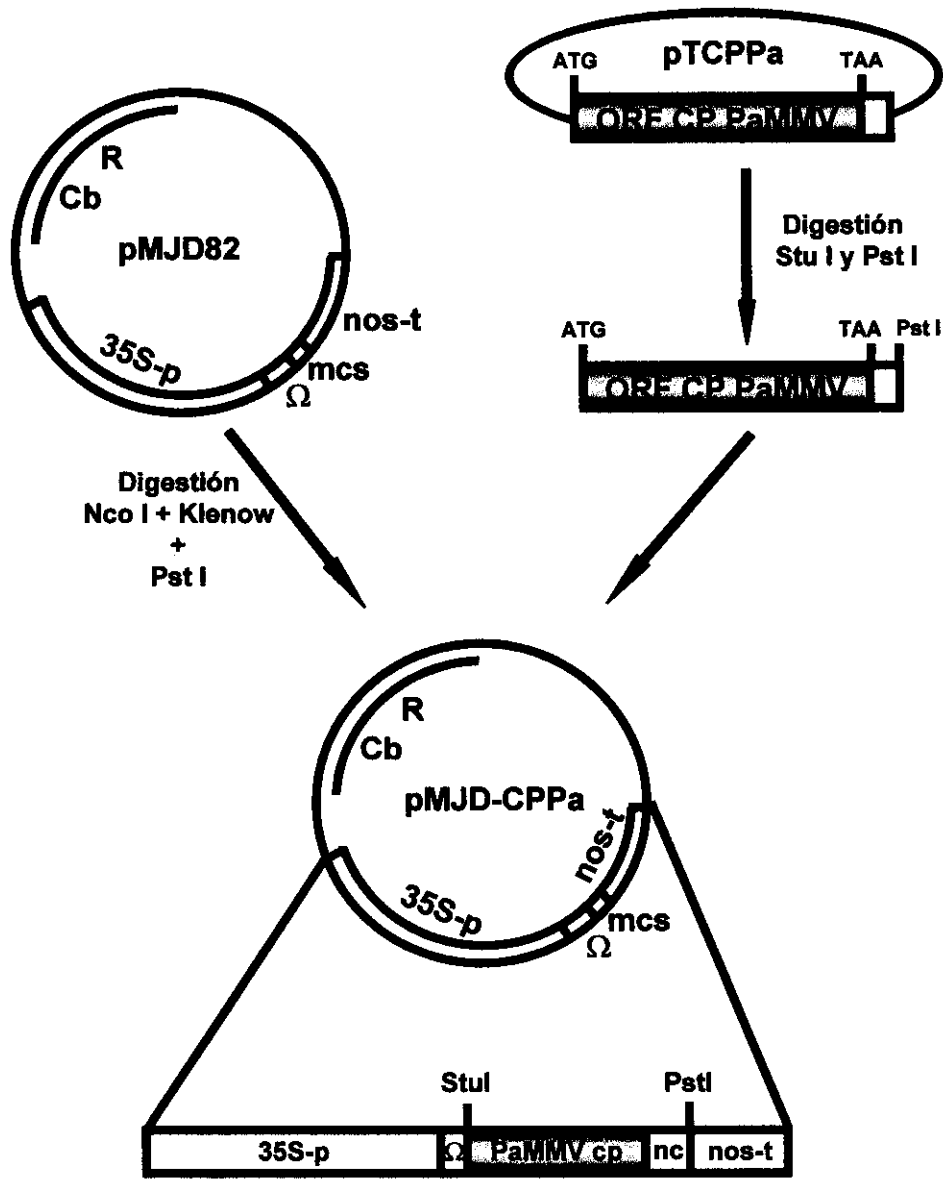


Figura 11. Esquema de la clonación de la CP de PaMMV en el vector de expresión en plantas pMJD82. La expresión de la proteína se encuentra bajo la acción del promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor y el enhancer Ω de TMV. La región codificadora de la proteína aparece en color gris y la no codificadora en blanco (nc). La secuencia proteica se encuentra seguida del terminador nos de la nopalina sintetasa.

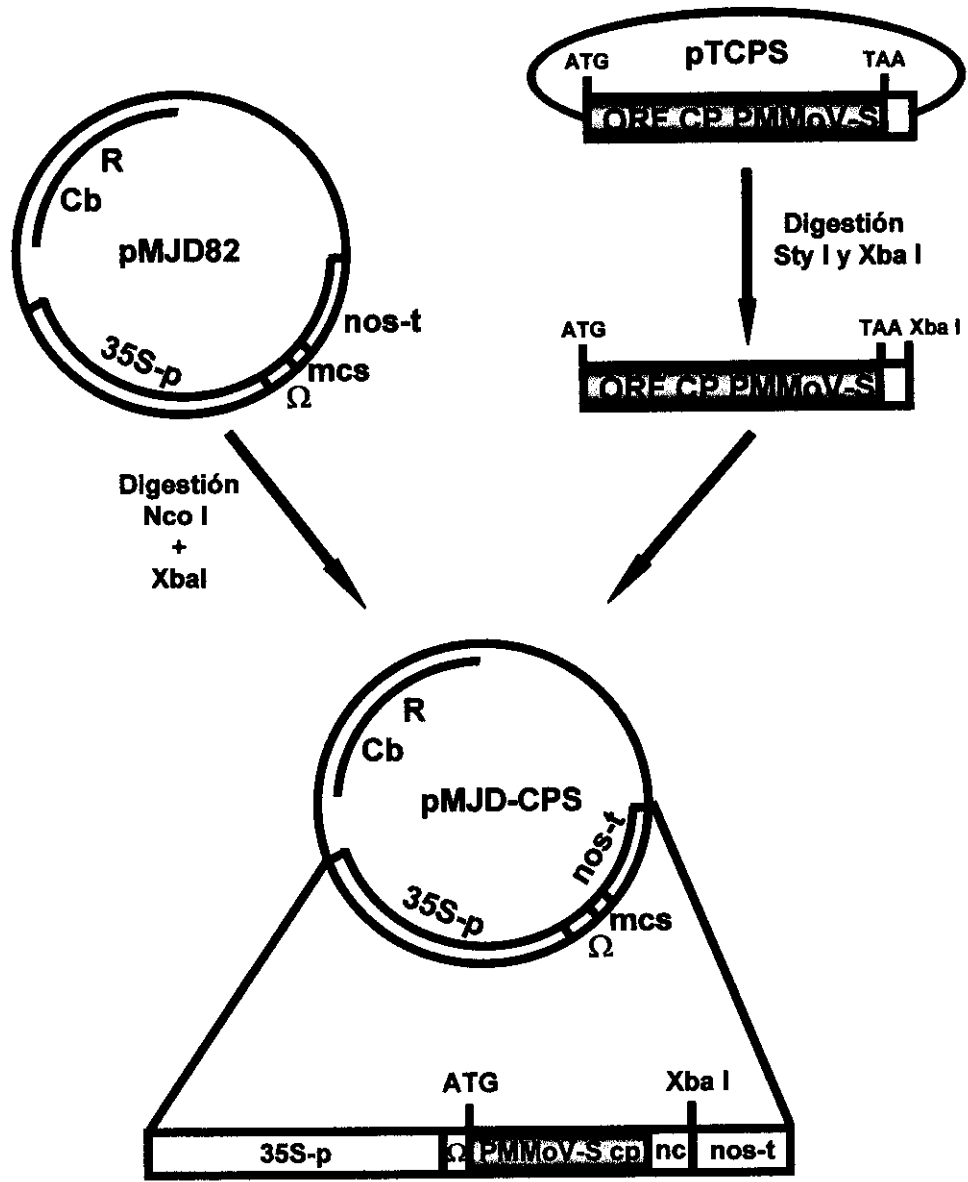


Figura 12. Esquema de la clonación de la CP de PMMoV-S en el vector de expresión en plantas pMJD82. La expresión de la proteína se encuentra bajo la acción del promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor y el enhancer Ω de TMV. La región codificadora de la proteína aparece en color gris y la no codificadora en blanco (nc). La secuencia proteica se encuentra seguida del terminador nos de la nopalina sintetasa.

pMJD-CPS (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg).

Después de la transfección las hojas se conservaron en placas petri en una atmósfera de humedad y fueron analizadas para detectar la actividad GUS a las 8, 16 y 24 horas post bombardeo (h.p.b.). En el ensayo histoquímico realizado a las 8 h.p.b. no pudimos detectar actividad de la enzima en ninguno de los casos. A las 16 h.p.b. se detectó actividad GUS en las hojas transfectadas con el control pMJD82/pMJD-GUS y con la combinación pMJD-CPS/pMJD-GUS y esta actividad fue mayor cuando se analizaron las hojas a las 24 h.p.b (figura 14). En las hojas transfectadas con la combinación pMJD-CPPa/pMJD-GUS no se detectó actividad de la enzima en ninguno de los tiempos analizados (figura 14).

Para determinar si la HR que induce la CP de PaMMV en *C. frutescens* se encuentra asociada a la inducción de un marcador de resistencia como las proteínas relacionadas con la patogénesis, se llevó a cabo un experimento similar al anterior en el que el gen GUS se encuentra bajo la acción del promotor de la β -1-3-glucanasa *gn1* de *N.plumbaginifolia* (Castresana *et al.*, 1990). Se ha visto que la expresión del promotor *gn1* es fuertemente inducido en plantas transgénicas de *N.tabacum* durante la HR que se desencadena por la infección de *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (Castresana *et al.*, 1990). Las combinaciones de plásmidos que fueron cotransfectadas en hojas de *C. frutescens* fueron las siguientes:

pMJD82 (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)

pMJD-CPPa (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)

pMJD-CPS (5 µg) + pgn1/GUS (2.5 µg)

Las muestras fueron analizadas para detectar actividad β -glucuronidasa a las 8,16 y 24 h.p.b. A las 8 h.p.b. no se pudo detectar actividad en ninguna de las muestras analizadas. A las 16 h.p.b. sólo se observó actividad en las hojas transfectadas con la combinación pMJD-CPPa/pgn1/GUS, siendo la actividad detectada mayor a las 24 h.p.b. (figura 15).

Con estos experimentos se ha determinado que la expresión de la proteína de cubierta de PaMMV, fuera de todo contexto viral, es capaz tanto de inducir la muerte celular como proteínas relacionadas con la resistencia en *C. frutescens*.

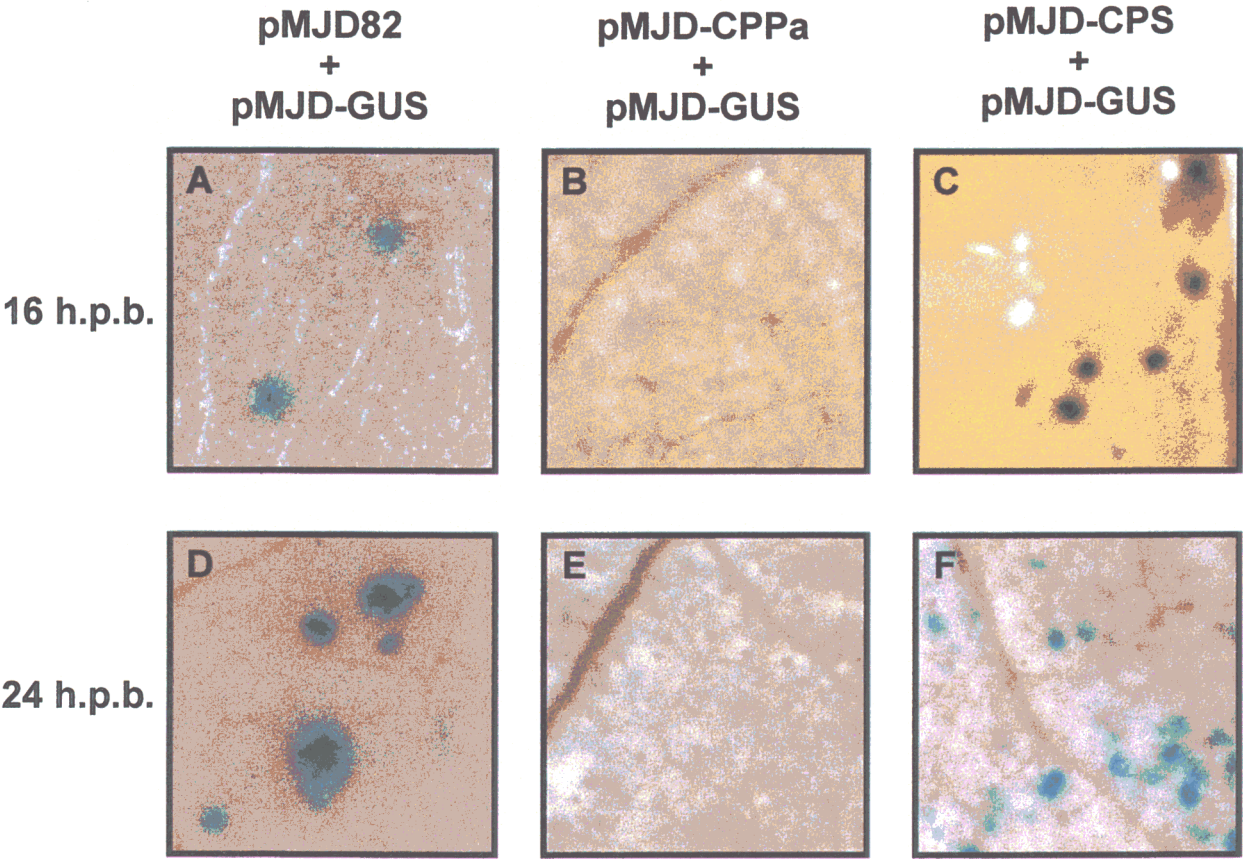


Figura 14. Efecto de la expresión transitoria de la CP de PaMMV (B, E) y PMMoV-S (C, F) en plantas de *C. frutescens* sobre la actividad β -glucuronidasa (GUS), expresada bajo la acción de un promotor constitutivo de plantas. Las hojas fueron cotransfectadas con las mezclas de las construcciones que se indican en la parte superior de la figura. La actividad GUS se midió a los tiempos postbombardeo que se indican en el lateral de la gráfica.

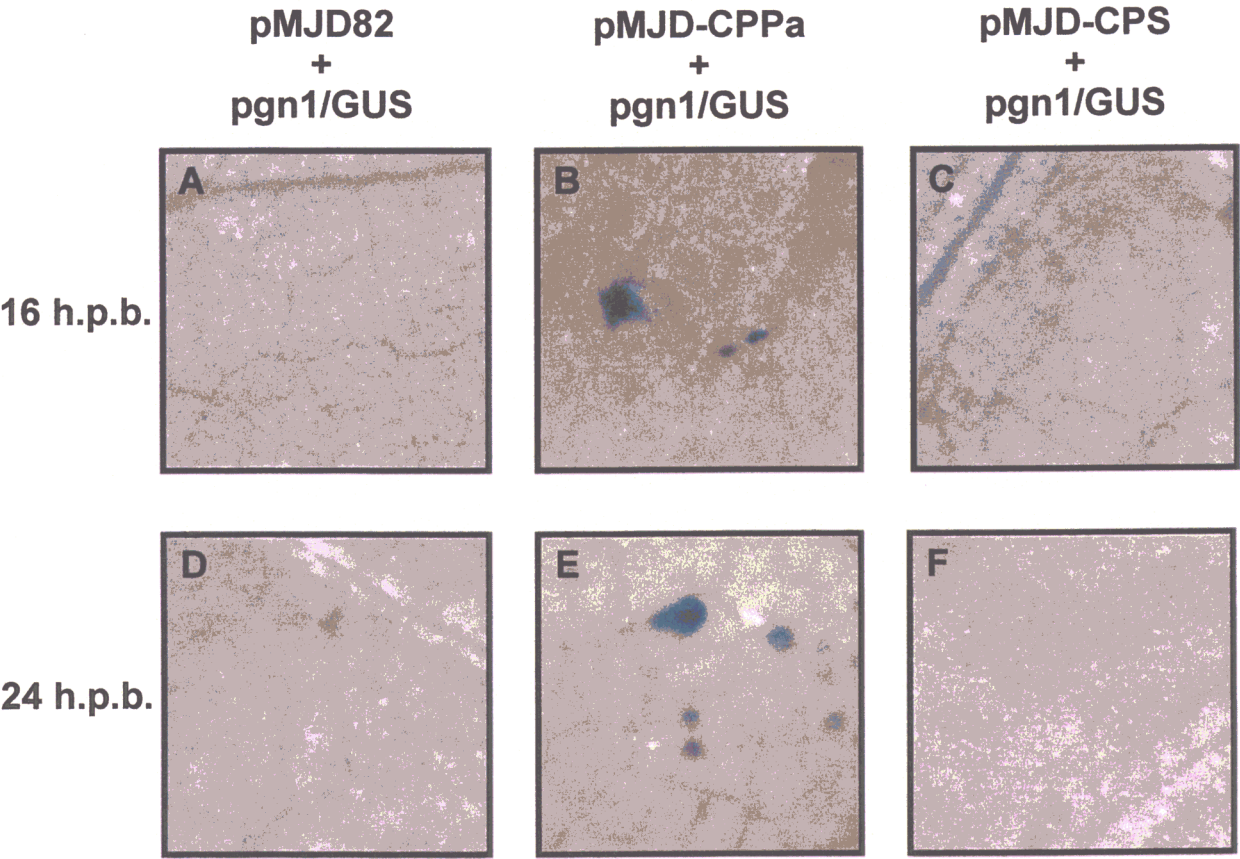


Figura 15. Efecto de la expresión transitoria en plantas de *C. frutescens* de la CP de PaMMV (B, E) y PMMoV-S (C, F) sobre la actividad β -glucuronidasa (GUS) bajo la acción de un promotor inducible por HR. Las hojas fueron transfectadas con la combinación de construcción que se muestran en la parte superior de la figura. La actividad GUS se midió a las horas post bombardeo indicadas en el lateral de la figura.

III.1.4. Estudio de los inductores virales de la resistencia en plantas de *C. chinense* (L³L³)

La resistencia que confiere el gen L³ frente a tobamovirus es activa frente a la mayor parte de los tobamovirus excepto para algunas cepas de PMMoV, como la cepa italiana (PMMoV-I).

Para determinar si la CP de los virus PaMMV o PMMoV-S era el único determinante viral responsable de la inducción de la resistencia en plantas de *C. chinense* (L³L³), plantas de esta especie se inocularon con savia de plantas de *N. benthamiana* infectadas con los virus quimera PVX-CPPa, PVX-CPS, y PVX. También se inocularon plantas con los tobamovirus PaMMV y PMMoV-S para establecer un control positivo tanto en la aparición de lesiones locales necróticas como en el seguimiento de la infección. Al igual que en *C. frutescens*, en este huésped se ensayaron distintas diluciones del inóculo procedente de las plantas de *N. benthamiana*.

En todas las diluciones ensayadas, la inoculación en plantas de *C. chinense* de los virus quimeras PVX-CPPa y PVX-CPS produjo a los 4-5 d.p.i. la aparición de lesiones locales necróticas en las hojas inoculadas. Estas lesiones se caracterizaron por tener una necrosis central y un halo clorótico alrededor. Aunque son similares a las producidas por los virus PaMMV y PMMoV-S, respectivamente, su morfología es algo diferente. Las lesiones producidas por el virus son más redondeadas y su diámetro es menor (fig), mientras que las producidas por los virus quimera son irregulares y algo más grandes.

En las plantas inoculadas con los distintos virus se recogieron muestras de HI y HS a los 5 y 15 d.p.i respectivamente y se analizó la presencia de las CPs virales por Western Blot y las secuencias de las CPs de PaMMV y PMMoV-S por RT-PCR (figuras 16 y 17).

En las plantas inoculadas con PVX-CPS, la CP de PMMoV-S y la secuencia de esta proteína no fueron detectadas en las hojas superiores no inoculadas (figura 17) en ninguno de los casos analizados, independientemente de la dosis de inóculo utilizada. La CP de PVX fue detectada en ambos tipos de hojas en un 80% de las plantas. El 20% restante no mostraron infección sistémica por el virus vector PVX. Cuando en el inóculo se mantenía una relación de 30-60 ng de proteína de cubierta de

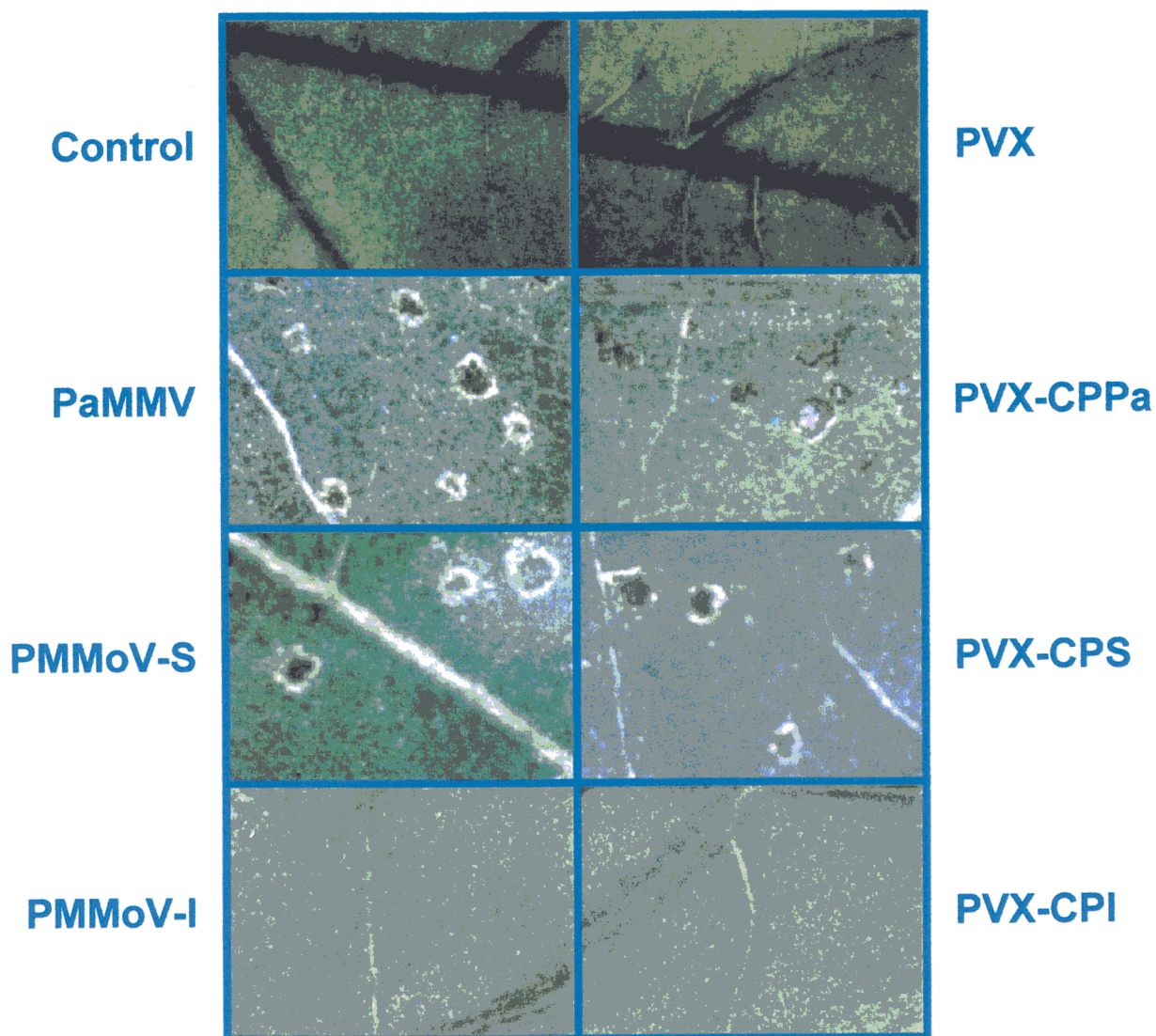


Figura 16. Sintomatología en hojas de plantas de *C. chinense* a los 4-5 d.p.i. en las hojas inoculadas con los virus indicados en los márgenes de la figura.

PMMoV-S y 1 µg de proteína de cubierta de PVX, observamos que existía suficiente cantidad de CPS para inducir la reacción hipersensible y confinar el virus vector PVX en las HI sin que se produjera infección sistémica (Tabla III). Este mismo resultado se obtuvo al inocular el virus quimera PVX-CPPa en las condiciones indicadas anteriormente (Tabla III).

Como hemos indicado anteriormente PMMoV-I es el único tobamovirus capaz de sobrepasar la resistencia conferida por el gen L³. Así pues, para determinar la especificidad de la interacción de las CPs de PaMMV y PMMoV-S y las plantas de *C. chinense* (L³L³), se procedió a infectar plantas de *C. chinense* con el virus quimera PVX-CPI. En las plantas de *C. chinense* inoculadas con este virus no se observó la aparición de lesiones locales necróticas en las hojas inoculadas a diferencia de lo que sucedía cuando se inoculaba con las progenies virales de los clones PVX-CPS y PVX-CPPa (figura 16). A los 15 d.p.i. estas plantas desarrollaron síntomas de necrosis sistémica semejantes a los producidos cuando se inoculaba el vector vacío (tabla III).

Tabla III. Inducción de síntomas en plantas de *C. chinense* inoculadas con los virus quimeras PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI, y con el virus PVX.

Síntomas desarrollados en plantas de <i>Capsicum chinense</i>			
Virus inductor	H.I. (5d.p.i.)	H.S. (5d.p.i.)	H.S. (15 d.p.i.)
PVX	Asintomático	Asintomático	Necrosis
PVX-CP11	LLN	Asintomático	Asintomático
PVX-CPS	LLN	Asintomático	Asintomático
PVX-CPI	Mosaico	Mosaico	Necrosis

A los 5 y 15 d.p.i. se detectó la proteína de cubierta viral de la cepa italiana tanto en las hojas inoculadas como en las hojas superiores de las plantas de *C. chinense* inoculadas con el virus quimera PVX-CPI. Del mismo modo por RT-PCR observamos la amplificación de un fragmento de 395 bp correspondiente a la proteína de la capsida del virus del moteado suave del tanto en HI como en HS (figura 19).

III.1.4.1.Inducción de marcadores de resistencia por la proteína de cubierta de PMMoV-S

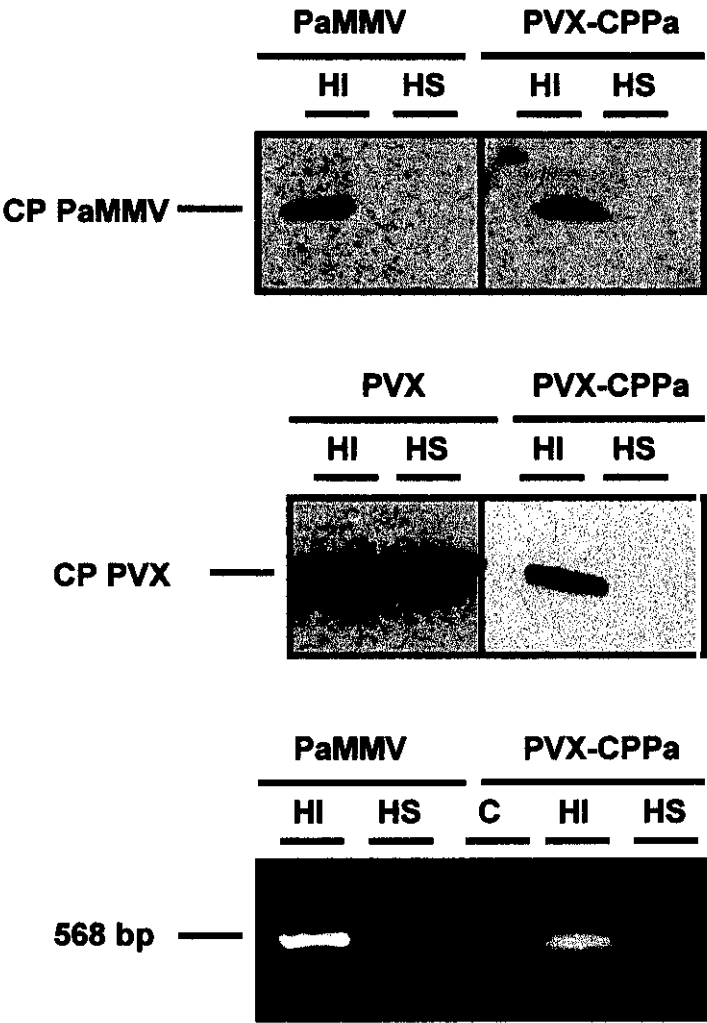


Figura 17. Detección de la secuencia y la CP de PaMMV y PVX en plantas de *C. chinense* inoculadas con los virus PaMMV-S y PVX, y con el virus quimera PVX-CPPa.
(A) Detección por Western Blot de la CP de PaMMV (superior) y PVX (inferior) en plantas inoculadas con los virus indicados en cada una de las figuras en HI a los 5 d.p.i. y en HS no inoculadas a los 15 d.p.i..
(B) Detección de la secuencia de la CP de PaMMV por RT-PCR en HI a los 5 d.p.i. y en HS a los 15 d.p.i.. Las plantas control (C) fueron inoculadas con tampón.

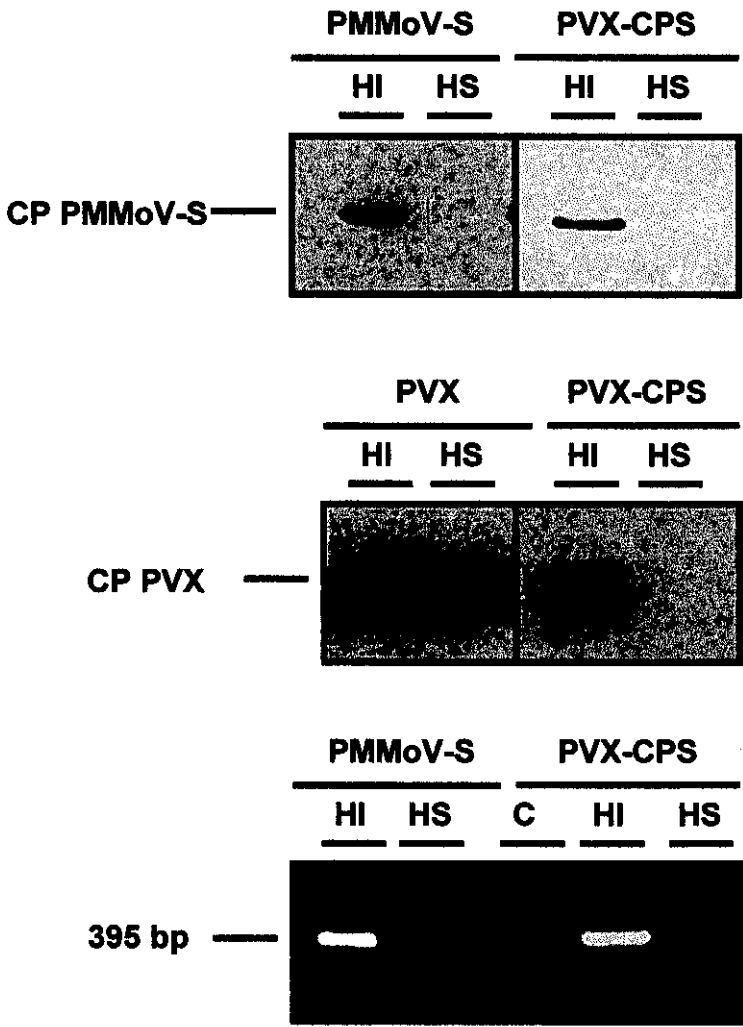


Figura 18. Detección de la secuencia y la CP de PMMoV-S y PVX en plantas de *C. chinense* inoculadas con los virus PMMoV-S y PVX, y con el virus quimera PVX-CPS.
(A) Detección por Western Blot de la CP de PMMoV-S (superior) y PVX (inferior) en plantas inoculadas con los virus indicados en cada una de las figuras en HI a los 5 d.p.i. y en HS no inoculadas a los 15 d.p.i..
(B) Detección de la secuencia de la CP de PMMoV-S por RT-PCR en HI a los 5 d.p.i. y en HS a los 15 d.p.i.. Las plantas control (C) fueron inoculadas con tampón.

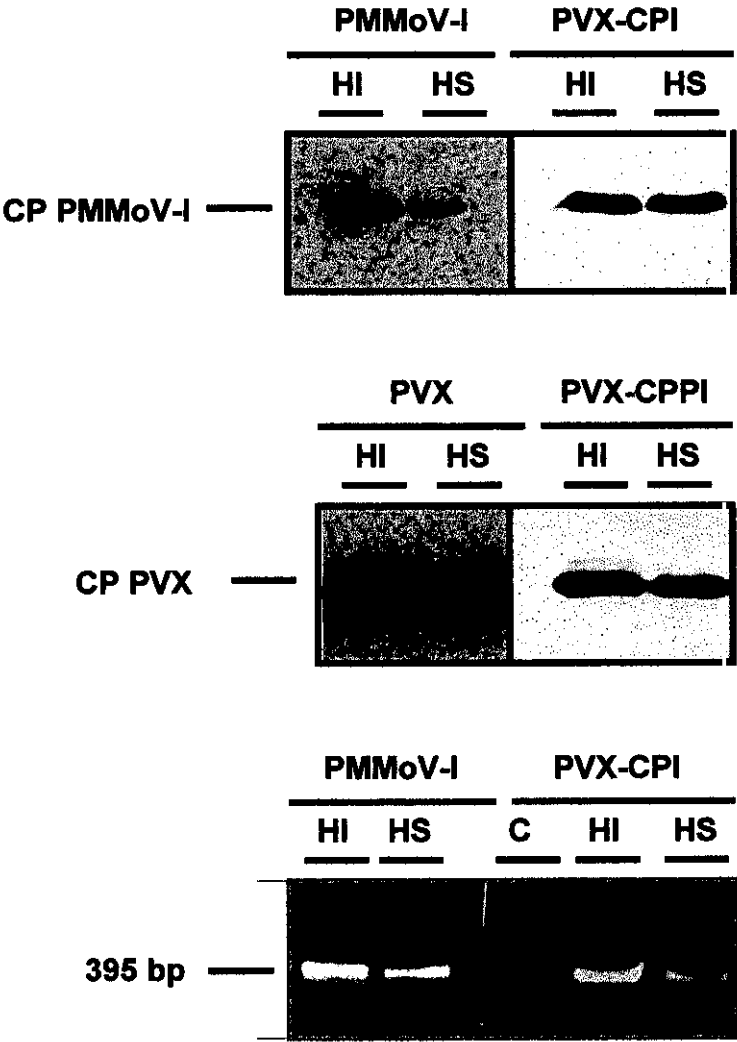


Figura 19. Detección de la secuencia y la CP de PMMoV-I y PVX en plantas de *C. chinense* inoculadas con los virus PMMoV-I y PVX, y con el virus quimera PVX-CPI.
(A) Detección por Western Blot de la CP de PMMoV-I (superior) y PVX (inferior) en plantas inoculadas con los virus indicados en cada una de las figuras en HI a los 5 d.p.i. y en HS no inoculadas a los 15 d.p.i..
(B) Detección de la secuencia de la CP de PMMoV-I por RT-PCR en HI a los 5 d.p.i. y en HS a los 15 d.p.i.. Las plantas control (C) fueron inoculadas con tampón.

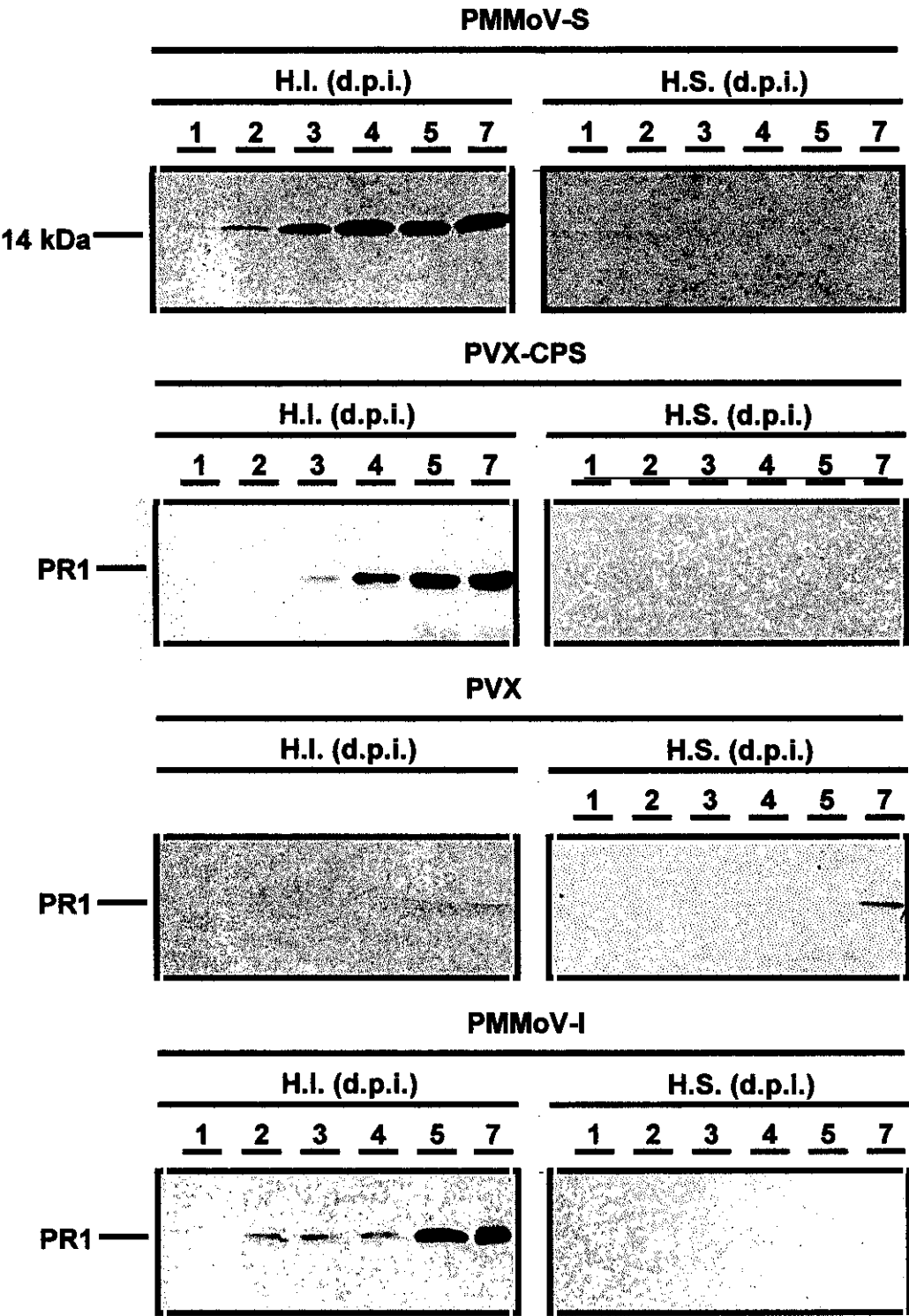


Figura 20. Detección de la proteína relacionada con la patogénesis PR1 en plantas de *C. chinense* inoculadas con las cepas española e italiana de PMMoV y PVX, y con el virus quimera PVX-CPPS, en hojas inoculadas (HI) y hojas superiores no inoculadas a los días post inoculación (d.p.i.) que se indican en cada carril.

Para determinar si la expresión de la proteína PR1 está asociada a la HR mediada por la expresión de la CP de PMMoV-S se inocularon plantas de *C. chinense* con las cepas S e I de PMMoV y con el virus quimera PVX-CPS y con el vector PVX solo. Las proteínas PRs se extrajeron a distintos tiempos postinoculación de las hojas inoculadas y de las hojas superiores no inoculadas. Análisis por Western Blot de las proteínas extraídas mostraron que la proteína PR1 se induce tanto en las hoja sinoculadas con el virus PMMoV-S como en las inoculadas con el virus quimera PVX-CPS. Esta proteína comienza a detectarse a los 2 d.p.i. en las plantas inoculadas con PMMoV-S y a los 3 d.p.i. en las plantas inoculadas con el virus quimera PVX-CPS. En las hojas inoculadas con el vector PVX solo, esta proteína solamente empezó a detectarse a tiempos tardíos de la inoculación y a unos niveles de expresión muy bajos, tal y como sucede en plantas inoculadas con el virus PMMoV-I (figura 20).

Estos resultados confirmaron que la CP de PMMoV-S es el único factor viral responsable de la inducción de la respuesta hipersensible en *C. Chinense* e induce no solo la muerte celular sino que también activa la síntesis y la acumulación de la PR1 de pimiento.

III.1.4.2. Estudio de la inducción de la muerte celular y genes asociados a la resistencia en plantas de *C. chinense*

Para establecer si la proteína de cubierta del virus es el inductor de la reacción de defensa en *C. chinense* (L^3L^3) fuera de ningún otro contexto viral empleamos el mismo sistema de expresión transitoria utilizado en el caso de plantas de *C. frutescens* var. Tabasco. Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron los plásmidos pMJD-CPS y pMJD-CPI que contienen las proteínas de cubierta de las cepas española e italiana de PMMoV en el vector de expresión en plantas pMJD82 bajo el promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y como gen marcador se utilizó la construcción pMJD-GUS en la que el gen GUS está bajo el mismo promotor que ambas proteínas de cubierta viral. Como control se utilizó el vector pMJD82 vacío.

En la figura 21 se puede observar el esquema de la estrategia seguida para el clonaje de la CP de PMMoV-I en el vector pMJD82.

Con estos clones se procedió a la transfección de plantas de *C. chinense* por la técnica de bombardeo con microproyectiles. Las partículas de oro se recubrieron con el ADN de las diferentes construcciones que se quieren transfectar. Para estos

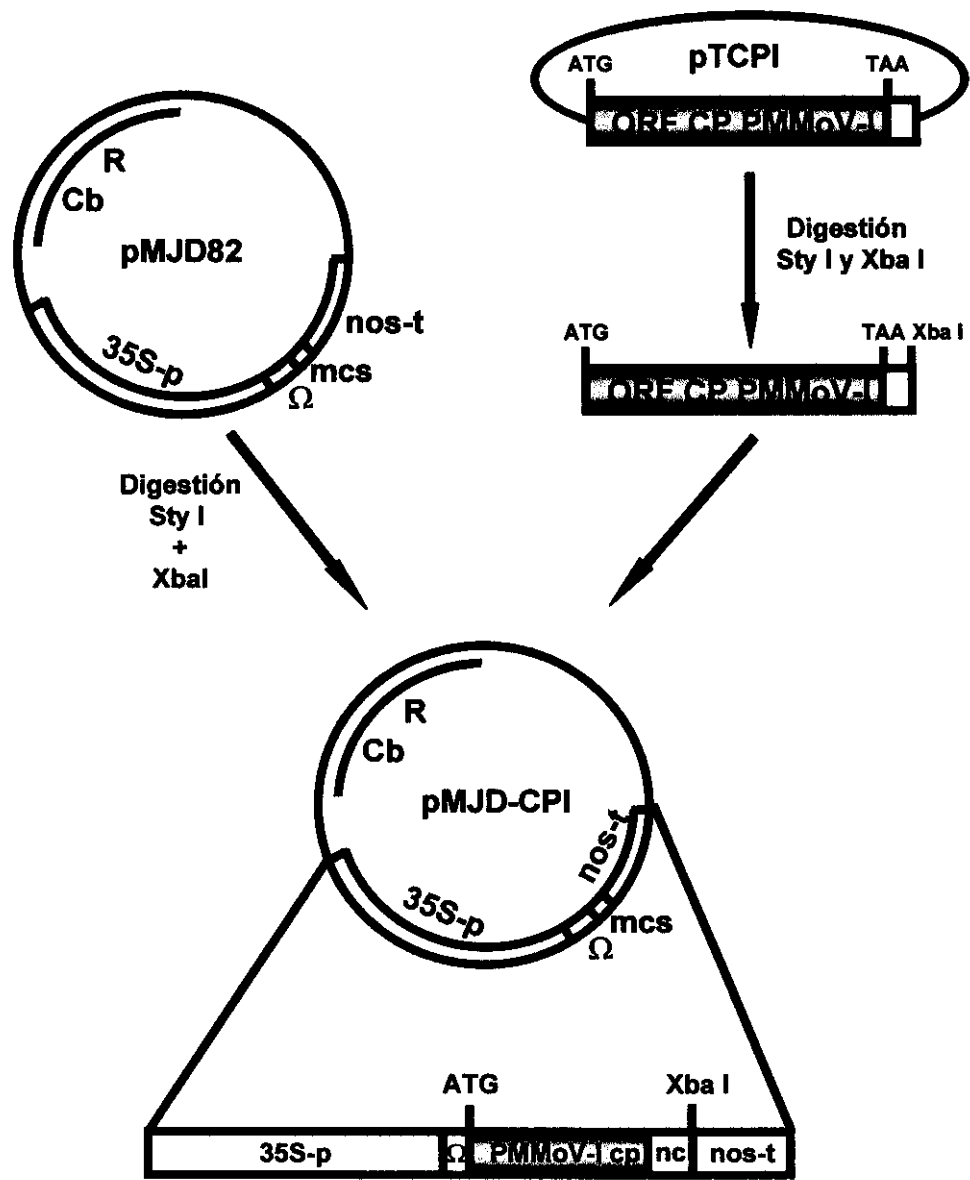


Figura 21. Esquema de la clonación de la CP de PMMoV-I en el vector de expresión en plantas pMJD82. La expresión de la proteína se encuentra bajo la acción del promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor y el enhancer Ω de TMV. La región codificadora de la proteína aparece en color gris y la no codificadora en blanco (nc). La secuencia proteica se encuentra seguida del terminador nos de la nopalina sintetasa.

experimentos las partículas de oro fueron recubiertas con las siguientes combinaciones de DNA:

pMJD82 (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)

pMJD-CPS (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)

pMJD-CPI (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg).

Una vez bombardeadas las hojas se conservaron en placas petri sobre papel de filtro humedecido. Entre los 3 y 5 días post bombardeo aparecieron LLN (figura 22) en hojas que habían sido transfectadas con el plásmido pMJD-CPS que contenía la CP de la cepa avirulenta, pero no en aquellas que habían sido transfectadas con la CP de la cepa compatible o con el vector vacío (figura 22).

Después de la transfección se realizó el ensayo histoquímico para detectar la actividad GUS a 8, 16 y 24 h.p.b.. En todos los casos a las 8 h.p.b. se observaron manchas azules, características de la actividad de la enzima GUS, si bien en hojas transfectadas con pMJD-CPS+pMJD-GUS el número de zonas con actividad GUS fue menor que cuando se transfectaban con las construcciones pMJD-CPI+pMJD-GUS o pMJD82+pMJD-GUS. En estos dos últimos casos las manchas azules de creciente intensidad fueron detectadas en las hojas en todos los tiempos analizados (figura 23). En contraste a las 24 h.p.b. en hojas transfectadas con pMJD-CPS+pMJD-GUS no se observaron manchas azules, indicando que la actividad GUS se había reducido a niveles indetectables (figura 23). Estos resultados demuestran que la proteína de cubierta de PMMoV-S es capaz por sí misma de inducir la muerte celular asociada a HR en plantas de *C. chinense*.

Además para determinar si la HR inducida por la CP de PMMoV-S se encuentra asociada a la inducción de genes de defensa se llevó a cabo un experimento similar al anterior utilizando como marcador el gen GUS bajo el control del promotor del gen *gn1* de la β -1-3-glucanasa de *N.plumbaginifolia* (Castresana et al., 1990). El análisis histoquímico de la actividad GUS reveló la presencia de manchas azules a las 24 h.p.b. en hojas transfectadas con pMJD-CPS+*gn1*/GUS, pero no cuando eran transfectadas con pMJD-CPI+*gn1*/GUS o con pMJD82+*gn1*/GUS (figura 24). Estos resultados demuestran que la expresión transitoria de la CP de PMMoV-S en hojas de *C. chinense* es capaz de activar la expresión de genes de defensa en la planta.

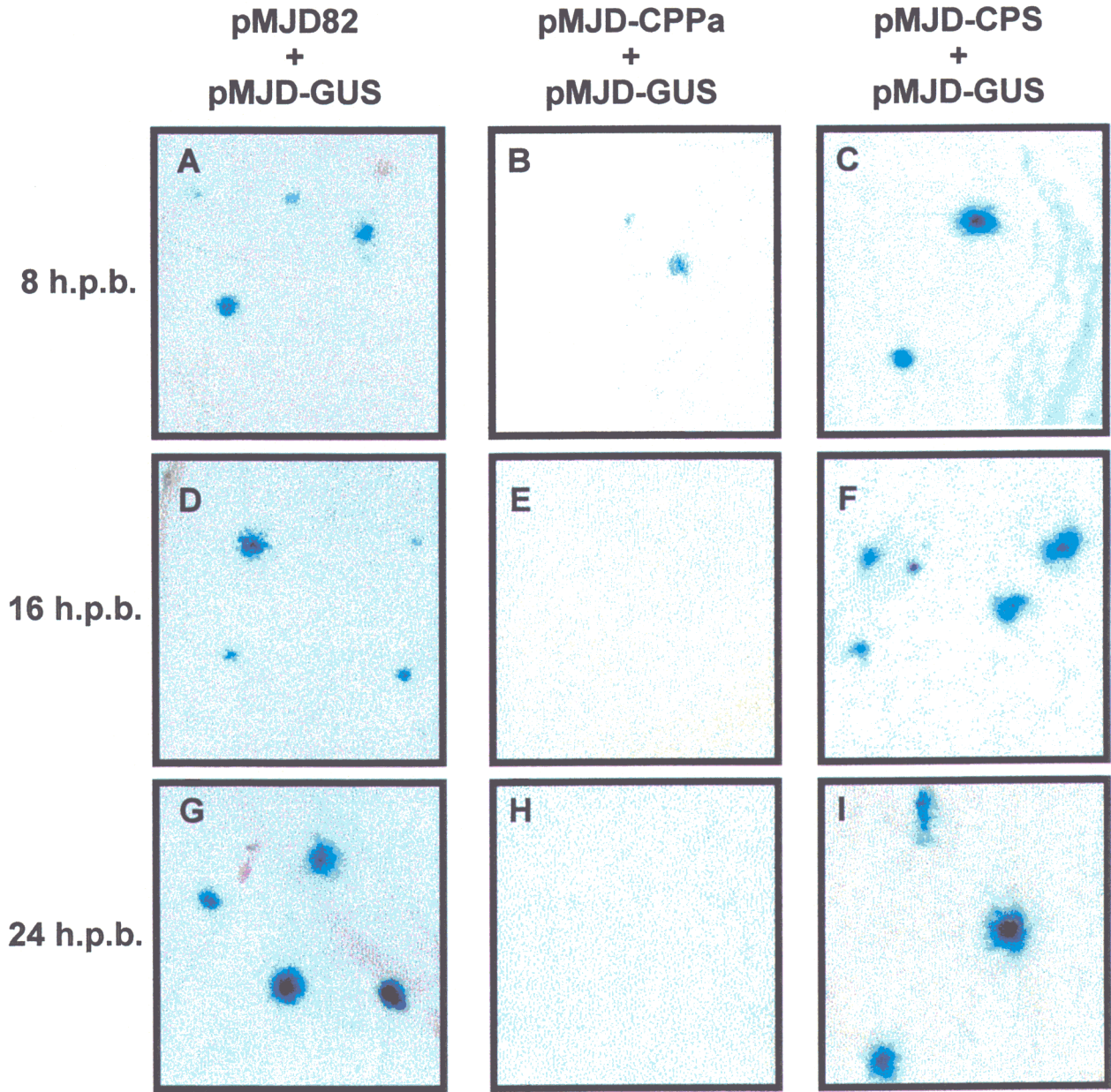


Figura 23. Efecto de la expresión transitoria de la CP de PMMoV-S (B, E, H) y PMMoV-I (C, F, I) en plantas de *C. chinense* sobre la actividad β -glucuronidasa (GUS), expresada bajo la acción de un promotor constitutivo de plantas. Las hojas fueron cotransfectadas con las mezclas de las construcciones que se indican en la parte superior de la figura. La actividad GUS se midió a los tiempos postbombardeo que se indican en el lateral de la gráfica.

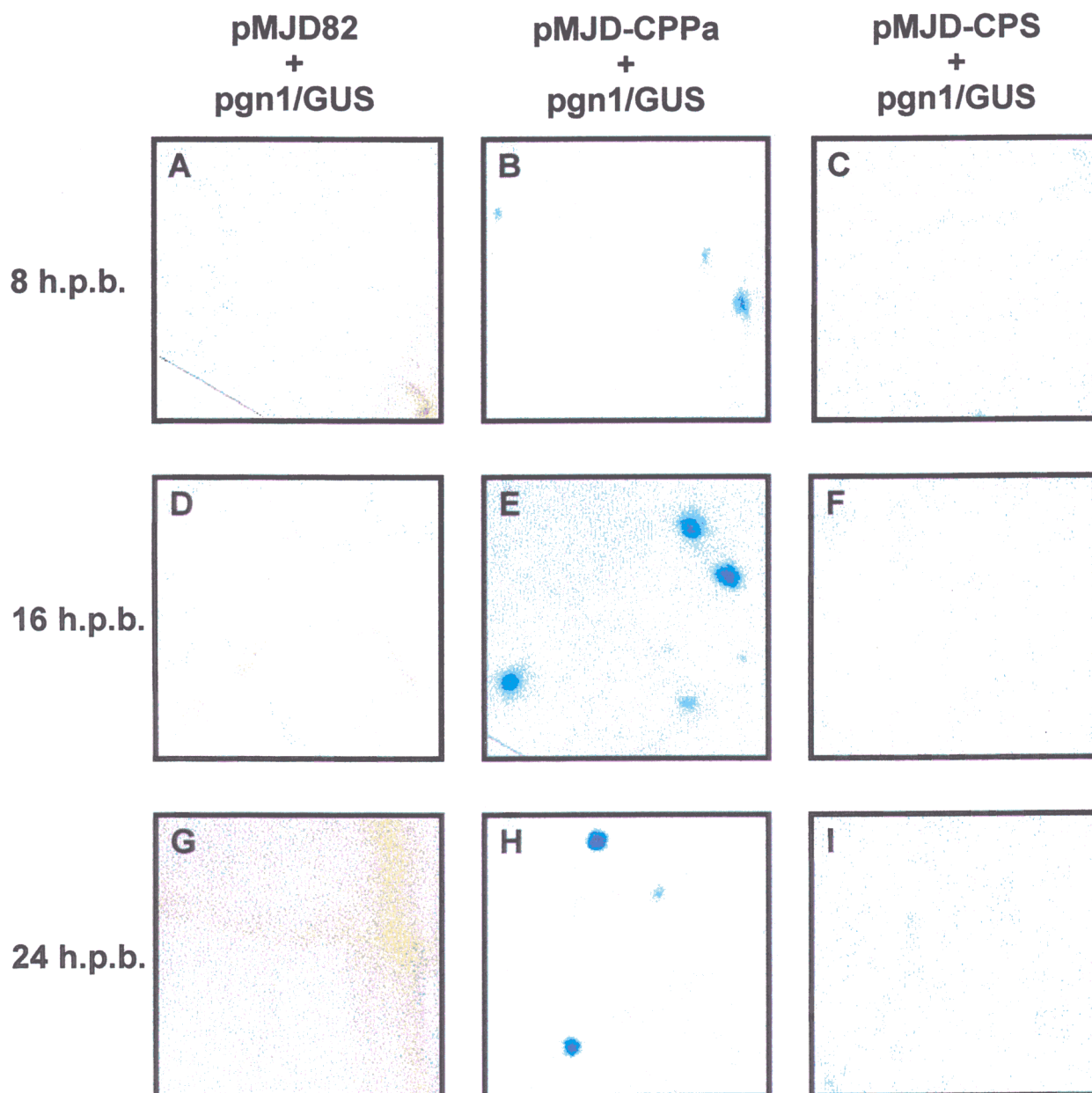


Figura 24. Efecto de la expresión transitoria en plantas de *C. chinense* de la CP de PMMoV-S (B, E, H) y PMMoV-I (C, F, I) sobre la actividad β -glucuronidasa (GUS) bajo la acción de un promotor inducible por HR. Las hojas fueron transfectadas con la combinación de construcciones que se muestran en la parte superior de la figura. La actividad GUS se midió a las horas post bombardeo indicadas en el lateral de la figura.

III.1.5. Estudio de los inductores virales de la resistencia en plantas de *C. chacoense* (L⁴L⁴)

El gen L⁴ de *C. chacoense* es efectivo frente a todos los tobamovirus descritos. Los virus PaMMV y las cepas S e I de PMMoV inducen la reacción hipersensible en las hojas inoculadas y quedan localizadas en dichas hojas.

Para determinar si la proteína de cubierta de los tobamovirus es el único determinante viral necesario para la inducción de la resistencia mediada por el gen L⁴, plantas de *C. chacoense* se inocularon con los virus quimera PVX-CPPa, PVX-CPS, PVX-CPI. Como controles de la infección se inocularon plantas con los virus PaMMV, las cepas S e I de PMMoV y PVX, y con tampón de inoculación. A los 5 d.p.i. se desarrollaron LLN en las HI de las plantas inoculadas tanto con los virus quimera como con los distintos tobamovirus. Las únicas plantas que no desarrollaron síntomas visibles fueron las plantas inoculadas con el virus vector PVX (figura 25).

Hay que destacar que en este huésped la morfología de las lesiones producidas por la progenie viral derivada de las construcciones PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI fueron diferentes a las producidas por los virus PaMMV y PMMoV. Las lesiones producidas por los virus quimera fueron más redondeadas y uniformes, y la zona central está rodeada por un halo necrótico que limita la lesión (figura 25). En las plantas inoculadas con PaMMV, PMMoV-S y PMMoV-I las lesiones son más expandidas e irregulares y las lesiones no se encuentran rodeadas por un halo necrótico.

A los 15 d.p.i. sólo se observaron síntomas sistémicos de necrosis en las plantas inoculadas con el virus vector PVX y con la construcción PVX-CPI

A los 5 y 15 d.p.i se analizaron en todas las plantas la presencia en HI y HS de las secuencias virales que codifican a las CP de los tobamovirus, así como la acumulación de las correspondientes proteínas y la CP de PVX del virus vector. En todas las plantas analizadas se detectó la CP de PaMMV y de las cepas S e I de PMMoV en las HI a los 5 d.p.i. así como la CP de PVX. Así mismo, a partir de los ARN totales de estas hojas, se amplificaron las bandas correspondientes a las secuencias de las CP de PaMMV y de PMMoV por RT-PCR. En las HS, a los 15 d.p.i., en ninguna

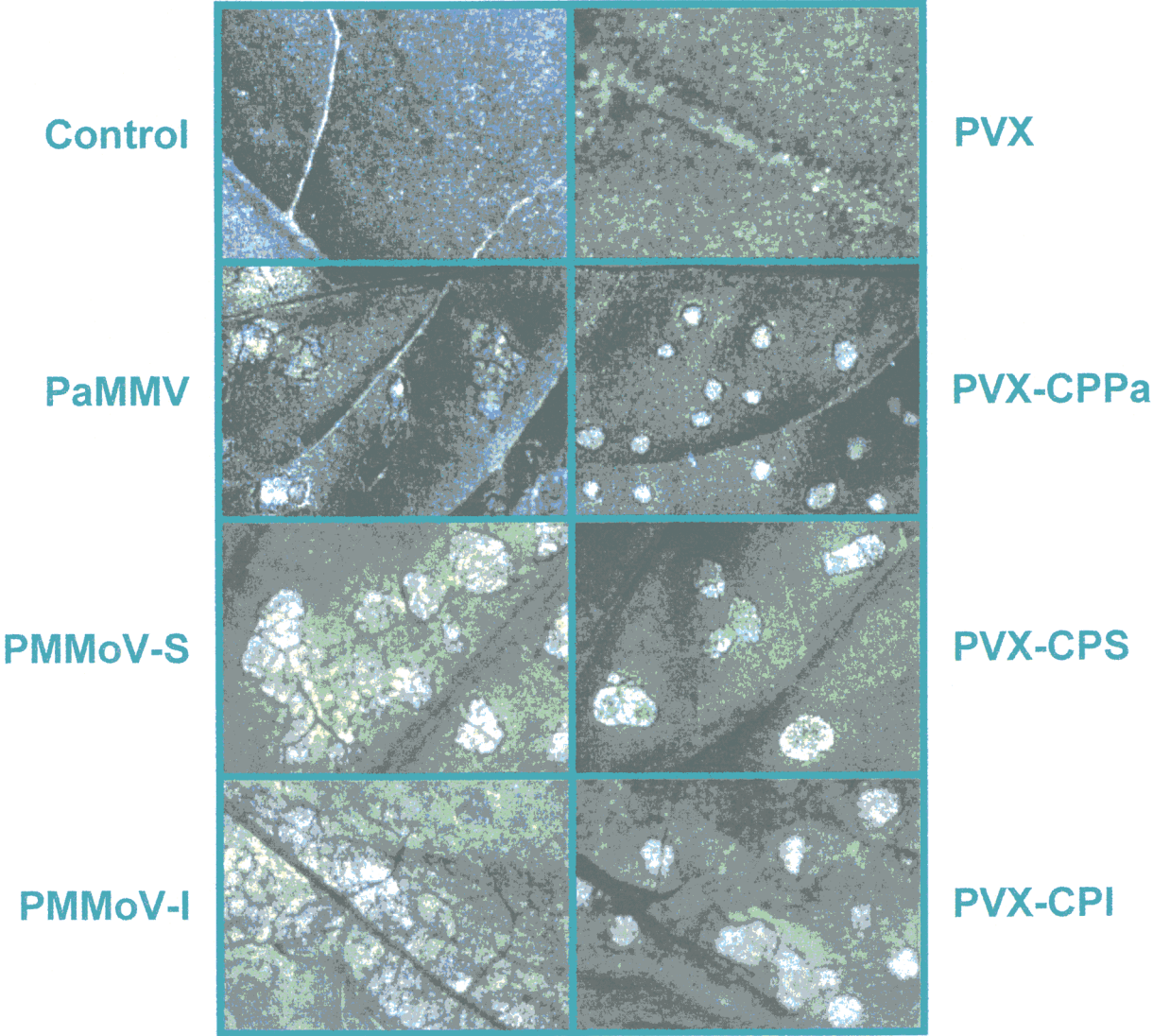


Figura 25. Sintomatología en hojas de plantas de *C. chacoense* a los 4-5 d.p.i. En las hojas inoculadas con los virus indicados en los márgenes de la figura.

de las plantas inoculadas se pudo detectar ni la CP de PaMMV ni de PMMoV ni su secuencia (figuras 26, 27 y 28). Por el contrario se pudo detectar la CP de PVX en HS de plantas inoculadas tanto con PVX como con PVX-CPI (figuras 26, 27, 28).

Tabla IV. Inducción de síntomas en plantas de *C. chacoense* inoculadas con los virus quimeras PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI, y con el virus PVX.

Síntomas desarrollados en plantas de <i>Capsicum chacoense</i>			
Virus inductor	H.I. (5d.p.i.)	H.S. (5d.p.i.)	H.S. (15 d.p.i.)
PVX	Asintomático	Asintomático	Necrosis
PVX-CP11	LLN	Asintomático	Asintomático
PVX-CPS	LLN	Asintomático	Asintomático
PVX-CPI	LLN	Asintomático	Necrosis

III.1.5.1.Inducción de marcadores de resistencia por la proteína de cubierta de PMMoV-S

Plantas de *C. chacoense* inoculadas con el virus quimera PVX-CPI, PVX y PMMoV-I fueron analizadas a diferentes tiempos pos inoculación para determinar si la inducción de la proteína PR1 se encuentra relacionada con la inducción de la resistencia mediada por la CP de PMMoV-I. En las plantas inoculadas con PMMoV-I (10 µg/ml) y PVX-CPI se observó una clara inducción en la expresión de esta proteína a partir del segundo d.p.i. En las HS de estas plantas se pudo detectar la presencia de esta proteína a niveles basales sin que se observara un incremento en su acumulación a lo largo del tiempo. Por otro lado en las plantas inoculadas con PVX se detectó la presencia de esta proteína a tiempos largos post inoculación y a niveles inferiores a los detectados en los casos anteriores.

Los resultados obtenidos permiten confirmar que la CP de PMMoV-I es el único factor viral responsable de la inducción de la respuesta hipersensible en plantas de *C. chacoense*. En estas plantas la CP de PMMoV-I es capaz de inducir los mecanismos que llevan a la muerte celular y la acumulación de la PR1 de pimiento.

III.1.5.2.Estudio de la inducción de la muerte celular y genes asociados a la resistencia en plantas de *C.chacoense*

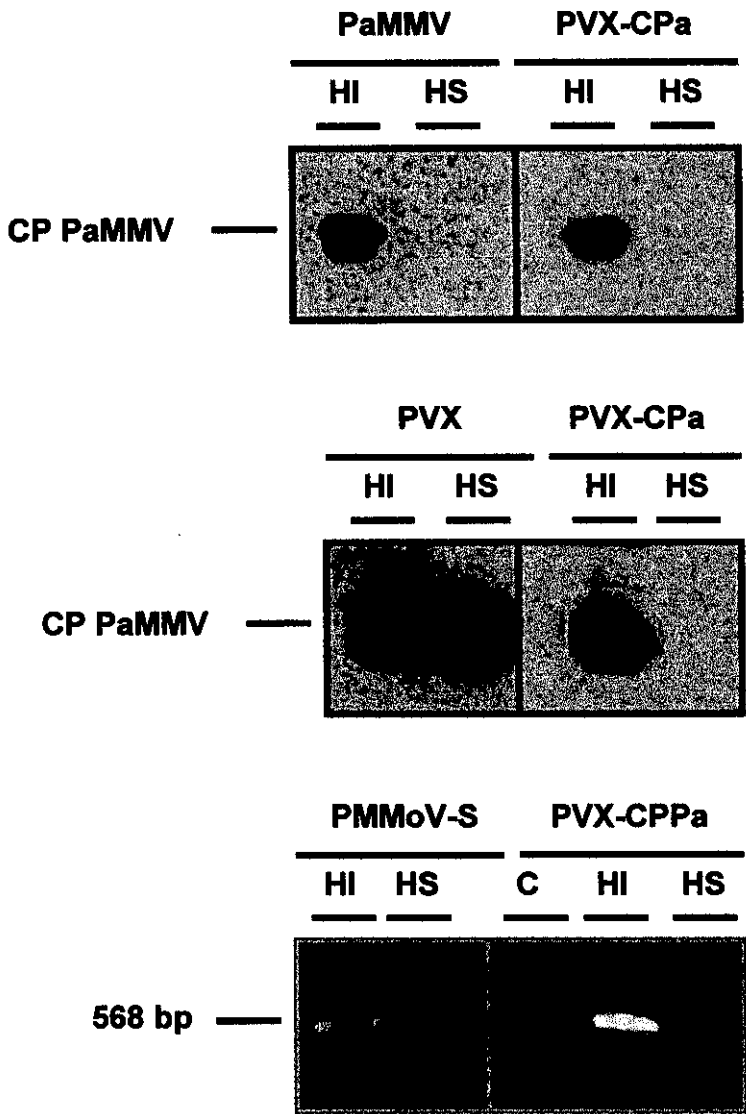


Figura 26. Detección de la secuencia y la CP de PaMMV y PVX en plantas de *C. chacoense* inoculadas con los virus PaMMV-S y PVX, y con el virus quimera PVX-CPPa.
(A) Detección por Western Blot de la CP de PaMMV (superior) y PVX (inferior) en plantas inoculadas con los virus indicados en cada una de las figuras en HI a los 5 d.p.i. y en HS no inoculadas a los 15 d.p.i..
(B) Detección de la secuencia de la CP de PaMMV por RT-PCR en HI a los 5 d.p.i. y en HS a los 15 d.p.i.. Las plantas control (C) fueron inoculadas con tampón.

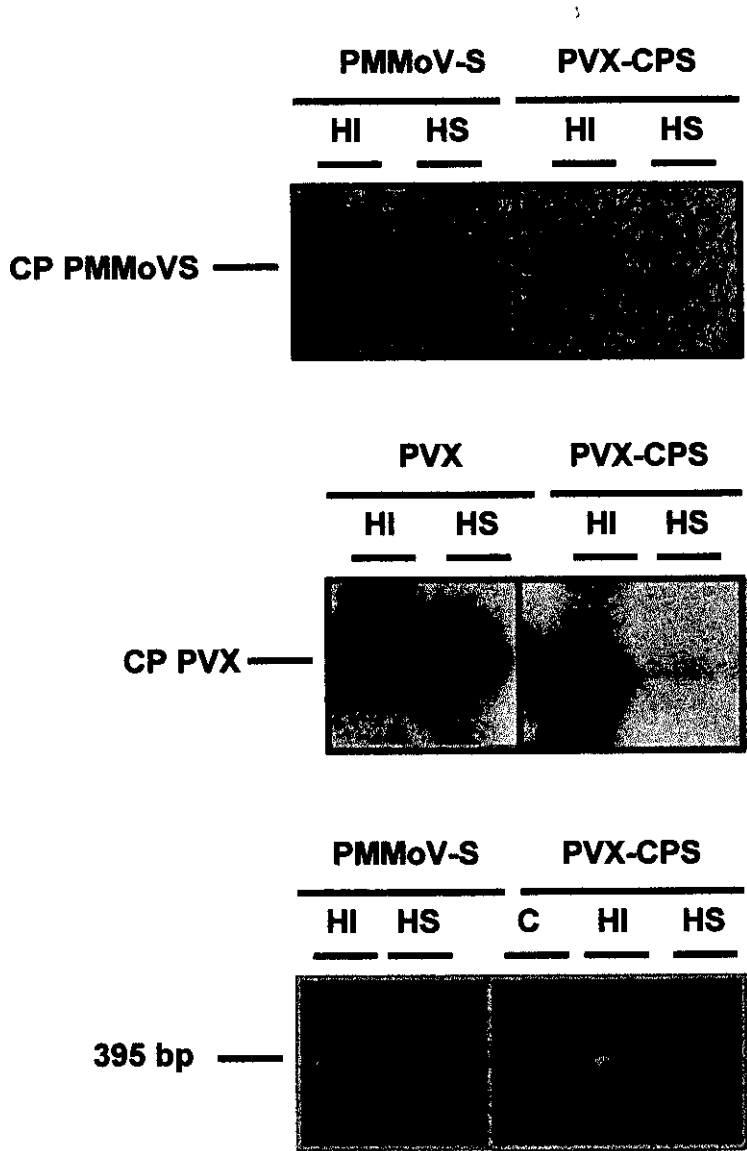


Figura 27. Detección de la secuencia y la CP de PMMoV-S y PVX en plantas de *C. chacoense* inoculadas con los virus PMMoV-S y PVX, y con el virus quimera PVX-CPS. (A) Detección por Western Blot de la CP de PMMoV-S (superior) y PVX (inferior) en plantas inoculadas con los virus indicados en cada una de las figuras en HI a los 5 d.p.i. y en HS no inoculadas a los 15 d.p.i.. (B) Detección de la secuencia de la CP de PMMoV-S por RT-PCR en HI a los 5 d.p.i. y en HS a los 15 d.p.i.. Las plantas control (C) fueron inoculadas con tampón.

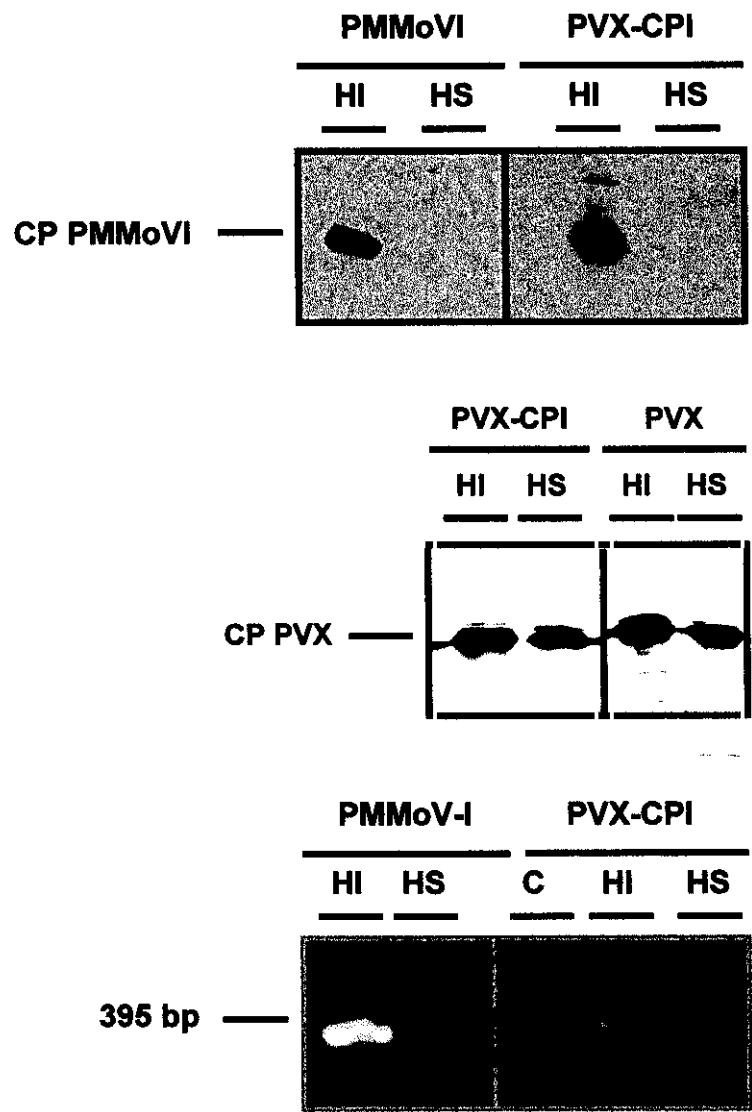


Figura 28. Detección de la secuencia y la CP de PMMoV-I y PVX en plantas de *C. chacoense* inoculadas con los virus PMMoV-I y PVX, y con el virus quimera PVX-CPI. (A) Detección por Western Blot de la CP de PMMoV-I (superior) y PVX (inferior) en plantas inoculadas con los virus indicados en cada una de las figuras en HI a los 5 d.p.i. y en HS no inoculadas a los 15 d.p.i.. (B) Detección de la secuencia de la CP de PMMoV-I por RT-PCR en HI a los 5 d.p.i. y en HS a los 15 d.p.i.. Las plantas control (C) fueron inoculadas con tampón.

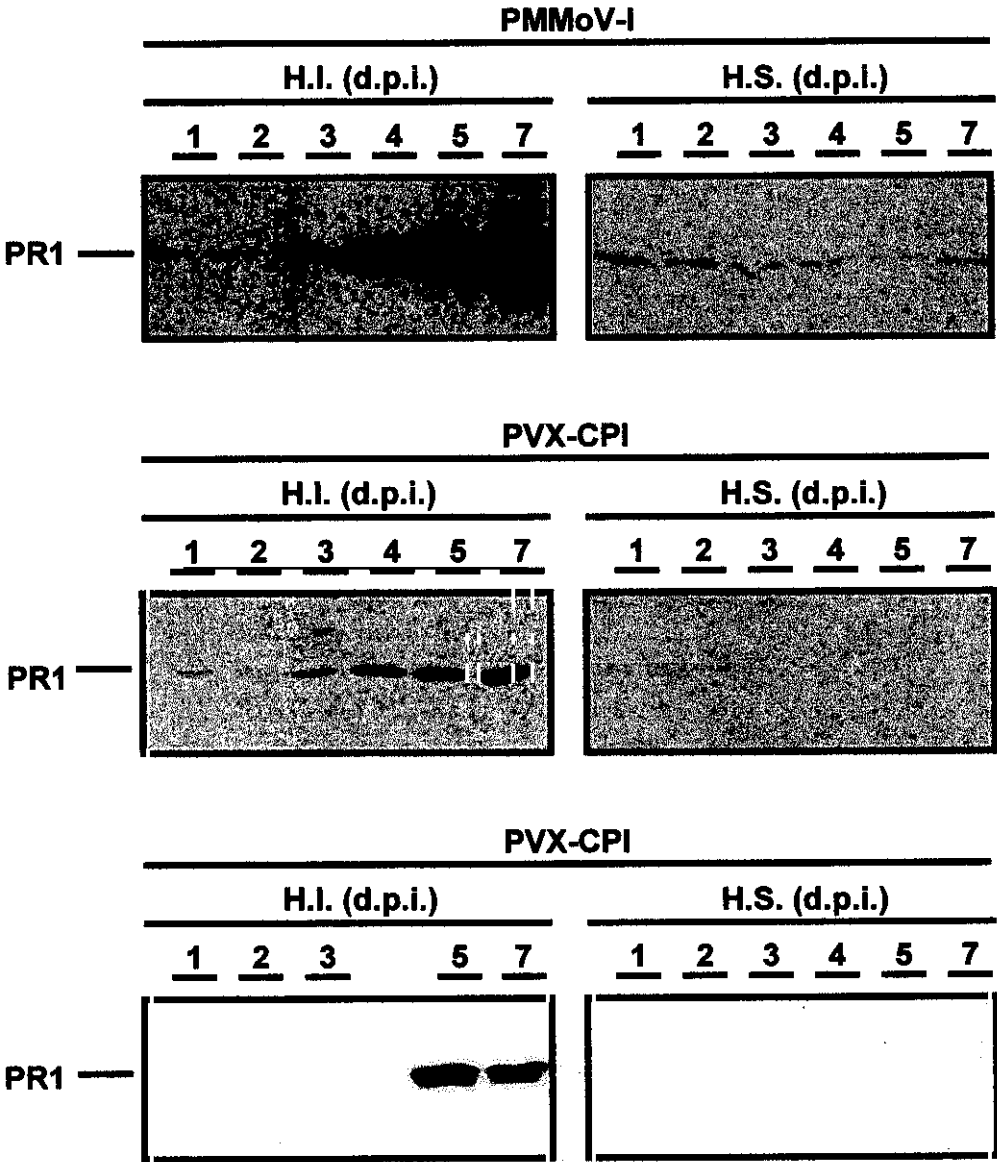


Figura 29. Detección de la proteína relacionada con la patogénesis PR1 en plantas de *C. chacoense* inoculadas con las cepa italiana de PMMoV y PVX, y con el virus quimera PVX-CPPI, en hojas inoculadas (HI) y hojas superiores no inoculadas a los días post inoculación (d.p.i.) que se indican en cada carril.

Para establecer si la proteína de cubierta del virus es el inductor de la reacción de defensa en *C. chacoense* (L⁴L⁴) fuera de otro contexto viral empleamos el mismo sistema de expresión transitoria utilizado en el caso de plantas de *C. frutescens* var. Tabasco y en *C. chinense*. Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó el plásmido pMJD-CPI (figura 21) en el que la expresión de la proteína de cubierta de PMMoV-I se encuentra controlada por el promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y como gen marcador se utilizó la construcción pMJD-GUS (figura 13) en la que el gen GUS está bajo el mismo promotor que ambas proteínas de cubierta viral. Como control se utilizó el vector pMJD82 vacío.

Con estos clones se procedió a la transfección de plantas de *C. chacoense* por una técnica biolística. Se dispararon sobre las hojas partículas de oro que se recubrieron con el ADN de las diferentes construcciones que se quieren transfectar. Para estos experimentos las partículas de oro fueron recubiertas con las siguientes combinaciones de DNA:

pMJD82 (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)

pMJD-CPI (5 µg) + pMJD-GUS (2.5 µg)

Una vez bombardeadas las hojas se conservaron en placas petri sobre papel de filtro humedecido.

A 8, 16 y 24 h.p.b. se analizó la actividad GUS mediante un ensayo histoquímico. A las 8 h.p.b. no se observó actividad enzimática con ninguna de las combinaciones transfectadas, al igual que sucedía con las plantas de *C. frutescens*. A las 16 y 24 h.p.b. se observó actividad en aquellas hojas transfectadas con pMJD82+pMJD-GUS, mientras que en las hojas transfectadas con pMJD-CPI+pMJD-GUS sólo se observó una ligera actividad a las 16 h.p.b. que desapareció cuando se analizaron las hojas 24 horas después de la transfección (figura 30). Estos resultados demuestran que la proteína de cubierta de PMMoV-I es capaz por sí misma de inducir la muerte celular asociada a la HR en plantas de *C. chacoense*.

Para determinar si la HR inducida por la CP de PMMoV-I se encuentra asociada a la inducción de genes de defensa se llevó a cabo un experimento similar al anterior utilizando como marcador el gen GUS bajo el control del promotor del gen *gn1*

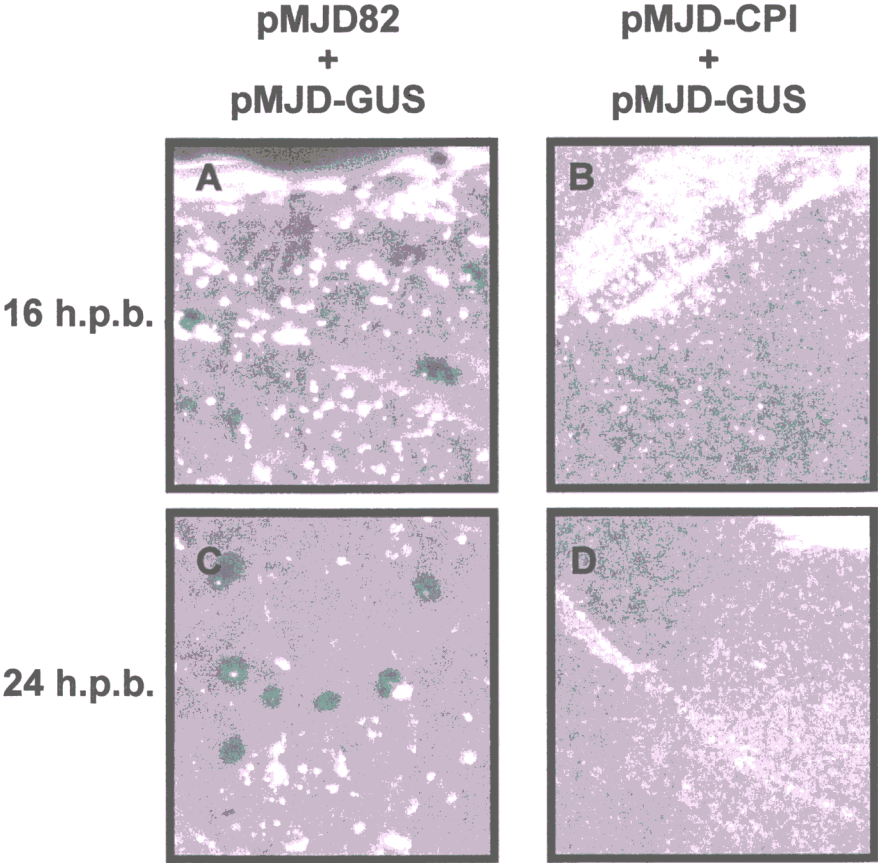


Figura 30. Efecto de la expresión transitoria de la CP de PMMoV-I (B, D) en plantas de *C. chinense* sobre la actividad β -glucuronidasa (GUS), expresada bajo la acción de un promotor constitutivo de plantas. Las hojas fueron cotransfectadas con las mezclas de las construcciones que se indican en la parte superior de la figura. La actividad GUS se midió a los tiempos postbombardeo que se indican en el lateral de la gráfica.

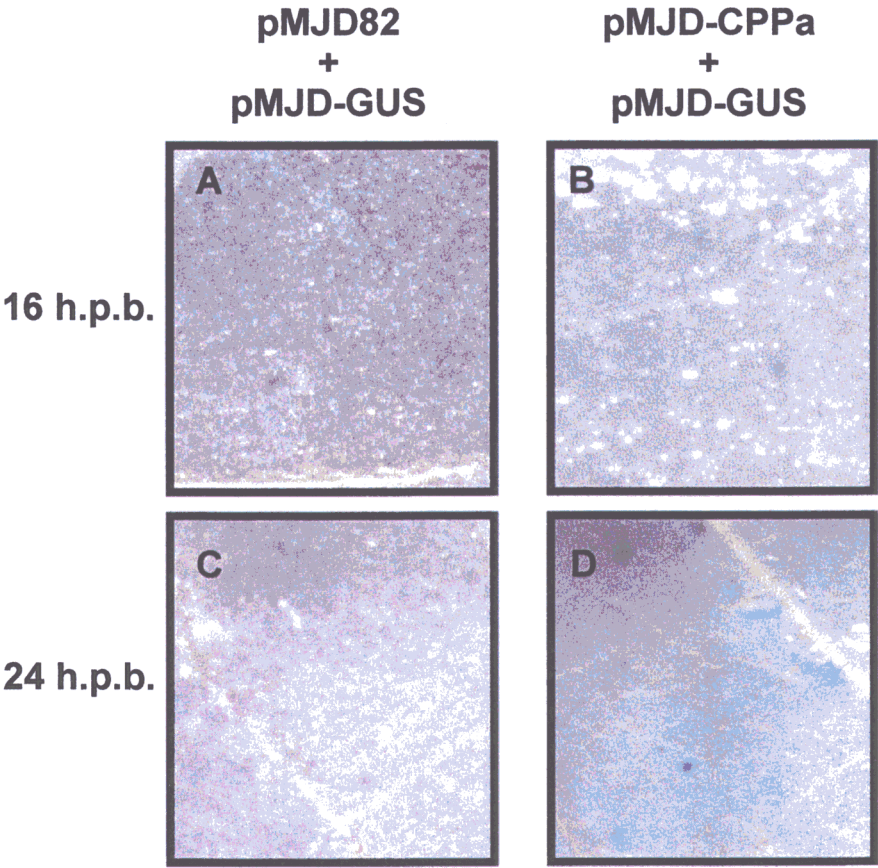


Figura 31. Efecto de la expresión transitoria de la CP de PMMoV-I (A, C) y PMMoV-I (B, D) en plantas de *C. chinense* sobre la actividad β -glucuronidasa (GUS), expresada bajo la acción de un promotor constitutivo de plantas. Las hojas fueron cotransfectadas con las mezclas de las construcciones que se indican en la parte superior de la figura. La actividad GUS se midió a los tiempos postbombardeo que se indican en el lateral de la gráfica.

de la β -1-3-glucanasa de *N.plumbaginifolia* (Castresana et al., 1990). Las combinaciones de ADN transfectadas fueron las siguientes:

pMJD 82+*gn1*/GUS

pMJD-CPI+*gn1*/GUS

El análisis histoquímico de la actividad GUS reveló la presencia de manchas azules a las 16 y 24 h.p.b. en hojas tranfectadas con pMJD-CPI+*gn1*/GUS, pero no cuando eran transfectedas con pMJD82+*gn1*/GUS. A las 8 h.p.b. al igual que sucedió cuando se transfectoron con las contrucciones anteriores no se pudo detectar actividad GUS en ninguna de las hojas analizadas (figura 31). Estos resultados demuestran que la expresión transitoria de la CP de PMMoV-I en hojas de *C. chacoense* es capaz de activar la expresión de genes de defensa en la planta.

III.2.Estudio de la resistencia frente a PMMoV en plantas de *Capsicum chinense*

III.2.1.Estudio del ciclo de replicación viral de PMMoV

Como un paso inicial del estudio de la resistencia frente a tobamovirus en plantas de *Capsicum chinense* (L³L³) estudiamos la evolución de la infección de PMMoV-S (patotipo P_{1,2}) y PMMoV-I (patotipo P_{1,2,3}). La inoculación de la cepa española de PMMoV en plantas de *C. chinense* desencadena un fenómeno de HR que lleva al confinamiento del virus en las hojas inoculadas (HI) dando lugar a la aparición de lesiones locales necróticas (LLN) en las hojas inoculadas con el virus a los 5 d.p.i.. En cambio, la cepa italiana del virus es capaz de sobrepasar la resistencia conferida por el gen L³ e infectar sistémicamente las plantas.

En la figura 32 se observa la cinética de acumulación de la proteína de cubierta de la cepa española e italiana de PMMoV en hojas inoculadas de *C. chinense*. Cuando las plantas fueron inoculadas con PMMoV-I, la CP comienza a acumularse a los 2 d.p.i. y continua haciéndolo de forma exponencial hasta los 11 d.p.i. Cuando las plantas fueron inoculadas con PMMoV-S la CP comienza a detectarse al mismo tiempo pero a una concentración 10³ veces menor y no sigue

Los máximos de acumulación para cada virus fueron de 78.125 ng/mg de tejido en el caso de la cepa española y de 327 µg/mg de tejido en el caso de la cepa italiana.

Se determinó también la cinética de acumulación de ARN virales en plantas infectadas con las dos cepas de PMMoV. En la figura 33 se puede observar la acumulación de las cadenas positivas del virus (33A) y las cadenas negativas (33B).

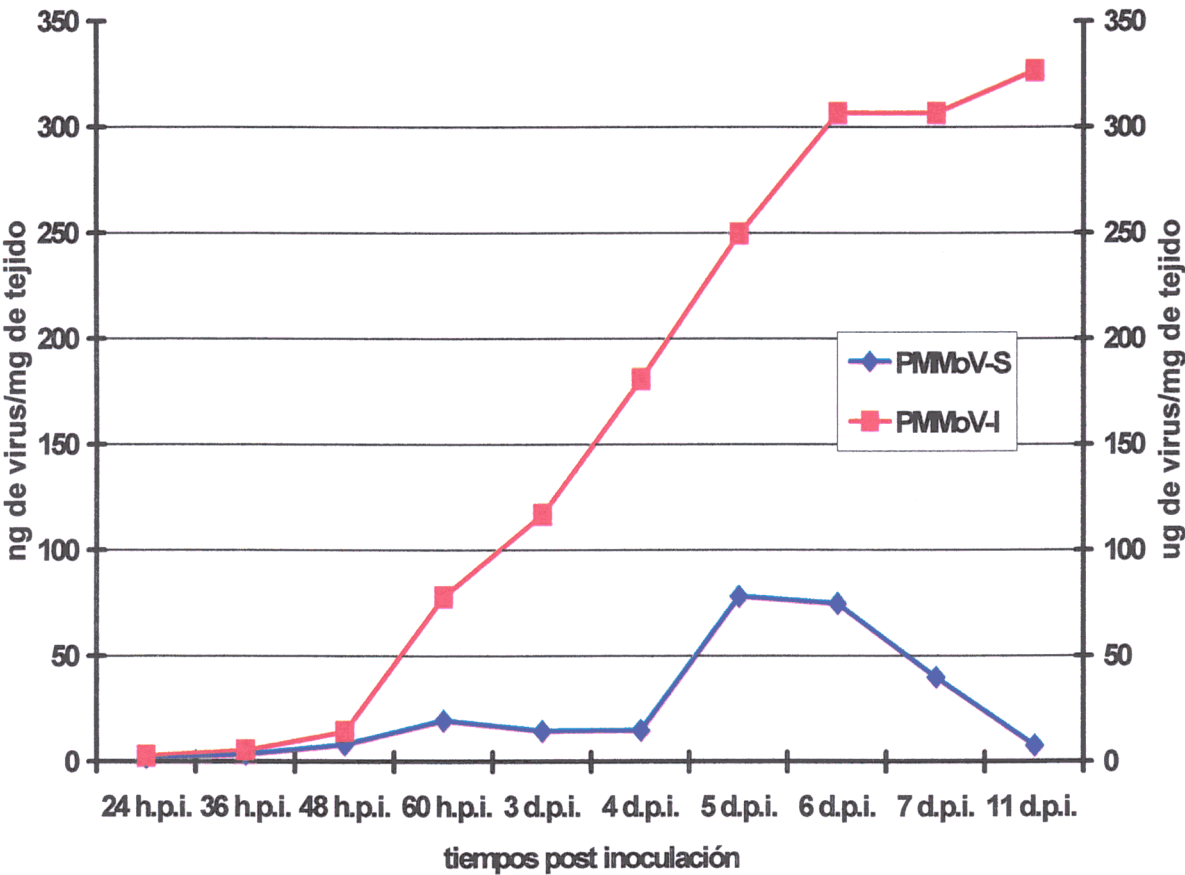


Figura 32. Curvas de acumulación de las proteínas de cubierta virales en HI de plantas de *C. chinense* inoculadas con PMMoV-S y PMMoV-I.

Analizando la figura 33A observamos que los patrones de acumulación de ARNs de las plantas inoculadas con las cepas inductora y no inductora de la resistencia son completamente diferentes. En las plantas inoculadas con PMMoV-I el ARN se puede detectar los 2 d.p.i. y su acumulación es creciente, llegándose a

máximos a los 7 d.p.i. En las HI con la cepa española de PMMoV aunque se comienza a detectar el ARN al mismo tiempo a 2 d.p.i., a partir de 3 d.p.i. la cantidad de ARN genómico permanece constante en el tiempo y el del subgenómico que corresponde a la CP del virus desciende a niveles casi indetectables.

La acumulación de las cadenas negativas (figura 33B) de los ARN virales sigue un patrón semejante al de las cadenas positivas. En las hojas inoculadas con la cepa italiana, a partir de los 2 d.p.i., hay un incremento constante de la cantidad de los ARN virales mientras que en las HI con la cepa española aunque el inicio de la detección se produce al mismo tiempo, la cantidad de ARN permanece en unos niveles relativamente constantes, si bien la acumulación de cadenas negativas es mayor que la de cadenas positivas.

Así pues, se puede decir que aunque existe una replicación basal de PMMoV-S y una cierta acumulación de cadenas positivas y negativas y de ARN subgenómico de la CP, la acumulación de ARN viral está afectada por la inducción de la resistencia. En el caso de PMMoV-I la acumulación de ARN de ambas polaridades es creciente en el tiempo en el que se han tomado las muestras y el ciclo de infección viral se desarrolla sin que se vea afectada su replicación en plantas de *C. chinense*.

III.2.2. Análisis de factores asociados a la respuesta de defensa

Como hemos señalado anteriormente, la HR es una de las respuestas de defensa más importante en plantas. Esta respuesta va acompañada de una serie de procesos tanto a nivel molecular como a nivel histológico. Entre los primeros está el estallido oxidativo, la activación transcripcional de la batería de genes de defensa, y la activación rápida de la muerte localizada de las células de la planta en los lugares de infección primaria del patógeno. Entre los segundos está la deposición de callosa y la formación de lesiones necróticas alrededor de las zonas infectadas. Para determinar estos parámetros durante el ciclo de infección de las cepas española e italiana de PMMoV en plantas de *C. chinense*, se analizaron la muerte celular y producción de especies reactivas de oxígeno, y se realizó un estudio histológico de las zonas en las que se estaba produciendo la infección.

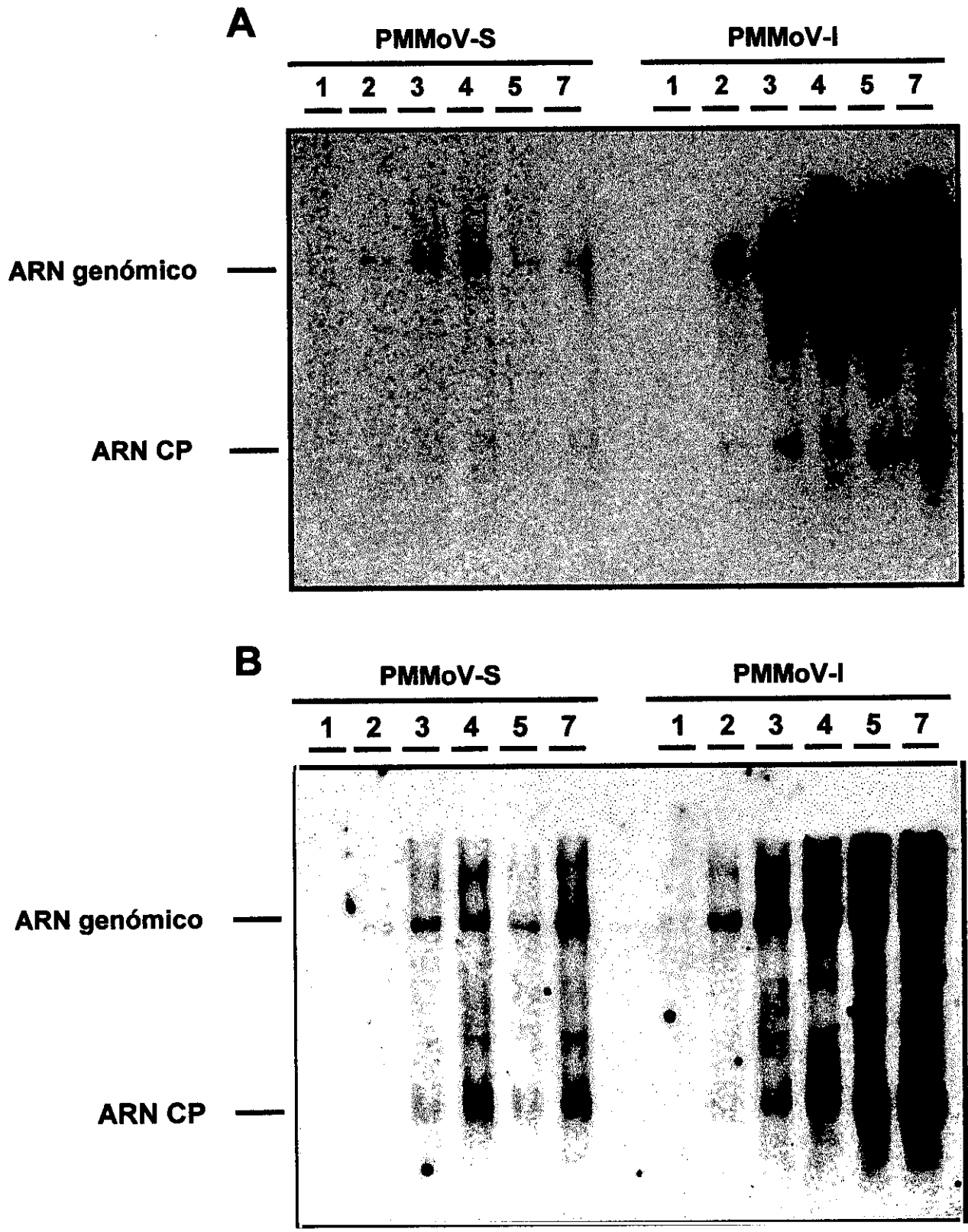


Figura 33. A) Análisis por Northern Blot de la acumulación de ARNs virales durante la infección de PMMoV-S y PMMoV-I en plantas de *C. chinense* A) negativas y B) positivas. Para su detección se utilizaron sondas de ARN de ambas polaridades correspondientes a la región de la proteína de cubierta de PMMoV-S.

III.2.2.1. Producción de especies reactivas de oxígeno

III.2.2.1.1. Producción de O_2^-

Para analizar la producción de aniones superóxido (O_2^-) se inocularon plantas de *C. chinense* con las cepas italiana (40 μ g/ml) y española (40 μ g/ml) de PMMoV, y con tampón. A partir de este momento se recogieron muestras a distintos tiempos postinfección. Como se muestra en la figura 3 hay una inducción muy temprana en la producción de O_2^- tanto en las plantas inoculadas con la cepa del virus inductor de la resistencia como en las inoculadas con la cepa no inductora.

Figura 34. Análisis de la presencia de aniones superóxido medido por su capacidad reductora del NBT en tejidos de plantas de *C. chinense* infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I. La actividad de las muestras infectadas por los virus se refiere a la actividad de las plantas inoculadas con tampón en cada tiempo analizado, considerando esta actividad con un valor absoluto de 1.

A partir de las 4-5 h.p.i. es cuando se observa una inducción diferencial de O_2^- en ambos tipos de interacciones. En las plantas inoculadas con PMMoV-S se llega a un máximo de producción de O_2^- a las 9 h.p.i. que llega a ser 2.6 veces superior a la observada en plantas control y 1.0 vez superior a la inducida en plantas inoculadas con el virus no inductor. A partir de este tiempo se produjo un descenso hasta que a las 24 h.p.i. no se detecta incremento de aniones superóxido con respecto al control. Posteriormente hay un nuevo repunte y se puede detectar anión superóxido en plantas inoculadas con ambos virus entre las 36 y las 72 horas posteriores a la inoculación.

III.2.2.2. Producción de H_2O_2

La producción de altas concentraciones de H_2O_2 se encuentra asociada a la infección de plantas por patógenos incompatibles y se considera que es una molécula que actúa como mensajero entre las células que han sido infectadas por el virus y las células próximas a éstas. Para determinar si existía producción de agua oxigenada en interacciones compatibles e incompatibles en plantas de *C. chinense* y si esta producción se encontraba asociada con alguna de ellas, se analizó la producción de H_2O_2 en plantas inoculadas con la cepa española (40 $\mu\text{g/ml}$) o la cepa italiana (40 $\mu\text{g/ml}$) de PMMoV. Como control negativo y para determinar que no se trataba de un fenómeno inespecífico se analizaron también plantas inoculadas con tampón.

Como se observa en la figura 35 en las 6 primeras h.p.i. hay una inducción de la producción de H_2O_2 que se detecta también en la interacción con la cepa no inductora de la resistencia. A partir de este tiempo existe una inducción diferencial entre los dos tipos de interacciones. En las hojas inoculadas con la cepa española de PMMoV se produce un incremento en la producción de H_2O_2 que llega a su máximo a las 10 h.p.i. y se mantiene hasta las 36-72 h.p.i. En estos tiempos los valores llegan a ser tres veces superiores a los observados en las plantas inoculadas con la cepa italiana del virus. Sin embargo, a tiempos más largos, a partir de las 36 h.p.i. la inducción en ambos casos es similar.

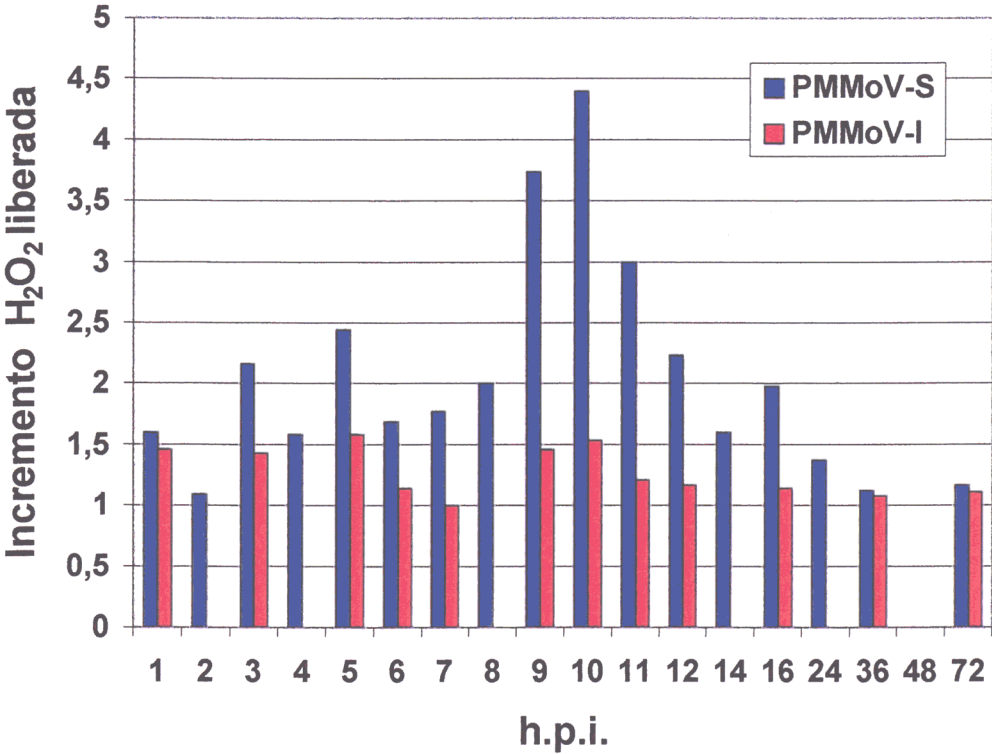


Figura 35. Cambios en la acumulación de H₂O₂ en plantas de *C. chinense* inducidos por la infección de las cepas S e I de PMMoV. Los resultados se reflejan como incrementos de la concentración de H₂O₂ liberada con respecto al control. A la cantidad determinada en cada tiempo en las a plantas inoculadas con tampón se le asignó un valor de 1.

III.2.2.2. Estudio de la fortificación de la pared celular

Uno de los procesos asociados a la respuesta de defensa en plantas es el refuerzo de la pared celular frente a patógenos que desarrollan reacciones incompatibles. La rápida deposición de callosa es frecuente en los lugares en los que se producen las interacciones huésped-parásito incompatibles y junto a la producción de compuestos autofluorescentes alrededor de las células que van a desarrollar la necrosis, han sido utilizados como marcadores histológicos de la reacción de defensa en plantas.

Para determinar si la resistencia a PMMoV-S en plantas de *C. chinense* va acompañada del fortalecimiento de las paredes celulares analizamos tanto la aparición de callosa a lo largo del ciclo de infección, así como la acumulación de compuestos autofluorescentes en el tejido infectado

En las muestras de plantas inoculadas con PMMoV-I, PMMoV-S y tampón no se observaron depósitos de callosa en tiempos anteriores a las 24 h.p.i.. A este tiempo se observó que en las plantas inoculadas con PMMoV-S había zonas discretas en las que se detectaban depósitos de callosa. Estas zonas se iban incrementando en número y tamaño a las 48 y 72 h.p.i.. En estos tiempos tardíos se observan depósitos de callosa no sólo en las células sino también en las paredes de los vasos. En el caso de las muestras de plantas inoculadas tanto con tampón como con la cepa no inductora de la resistencia no se observó la existencia de depósitos de callosa en las muestras analizadas (figura 36).

Asociada a la aparición de la necrosis en las células vegetales se produce la acumulación de compuestos derivados de la ruta del fenilpropanoico que es altamente estimulada durante la HR. Como en el caso de los depósitos de callosa no se detectó autofluorescencia en las muestras analizadas bajo luz UV antes de las 24 h.p.i.. A partir de este tiempo se observó una aparición gradual de las zonas fluorescentes en las plantas inoculadas con la cepa inductora de la resistencia. A las 48 y 72 h.p.i. estas zonas eran más numerosas y de mayor tamaño (figura 6).

Cuando se analizaron las muestras inoculadas con PMMoV-I y con tampón no se observó la fluorescencia debida a los compuestos fenólicos en ninguna de las muestras analizadas (figura 37).

III.2.2.3. Estudio de la inducción de la muerte celular

Para este estudio utilizamos el método de Baker y Mock (1994). La base de este sistema está en que las células muertas acumulan una mayor cantidad del colorante Evans Blue, por lo cual una vez que efectuamos las medidas espectrofotométricas aquellos tejidos en los que se produce muerte celular mostraran incrementos de absorbancia mayores que en los que no se produce.

En las gráficas representadas en la figura 38 se muestran los resultados obtenidos al analizar las hojas inoculadas con los dos virus. Como se puede observar, se produjo un incremento de muerte celular constante en las plantas que fueron inoculadas con la cepa española de PMMoV a partir de las 8 h.p.i.. El incremento de

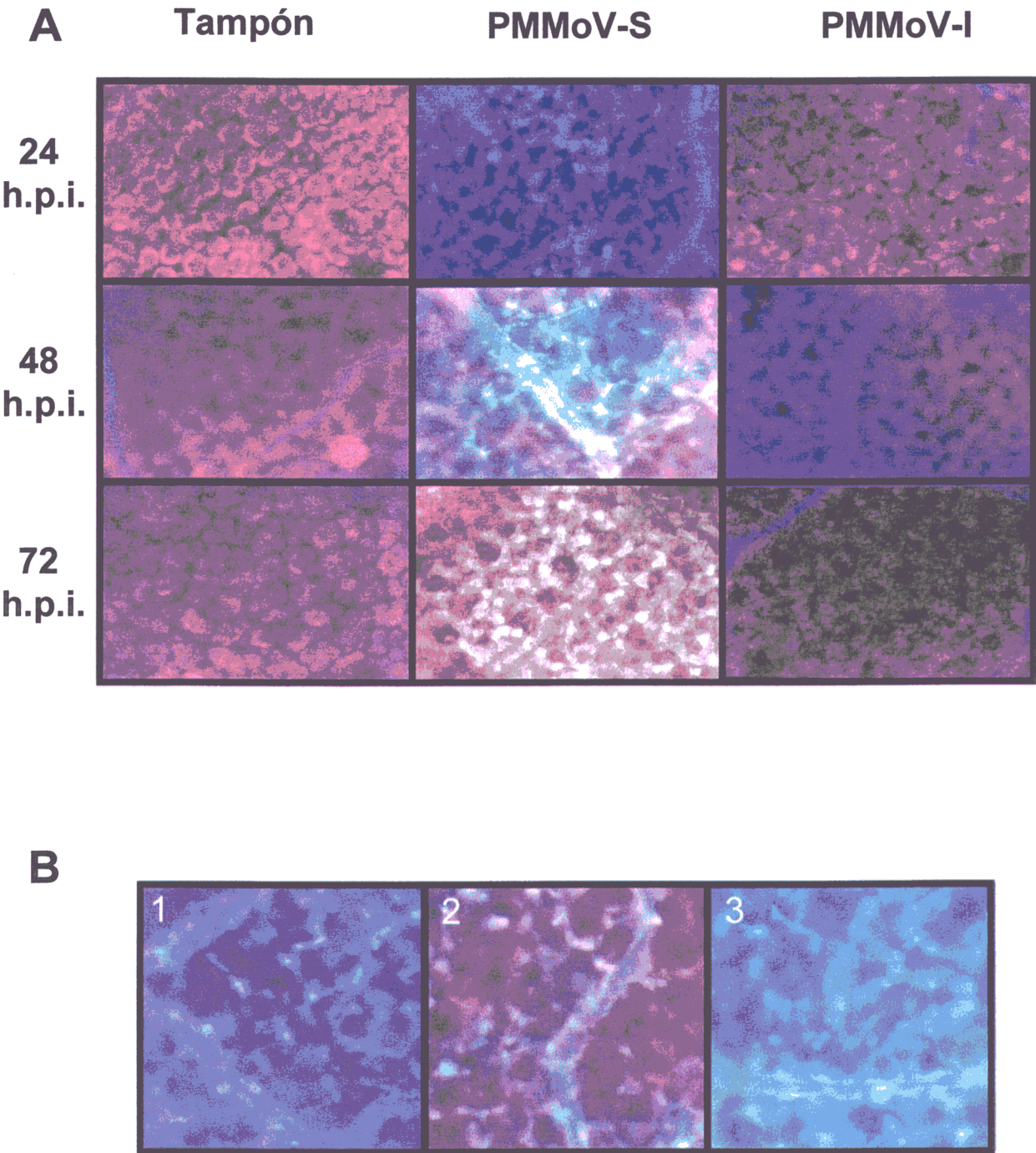


Figura 36. (A) Deposición de callosa alrededor de las célulasde *C. chinense* inoculadas con los virus y tampón que aparecen en la parte superior de la figura. Las muestras fueron recogidas a los tiempos post inoculación que se indican en el lateral de la figura.

(B) Deposición de callosa en las paredes de las venas de hojas de *C. Chinense* inoculadas con PMMoV-S. Las muestras se recogieron a las 48 h.p.i. (1 y 2) y a las 72 h.p.i. (3).

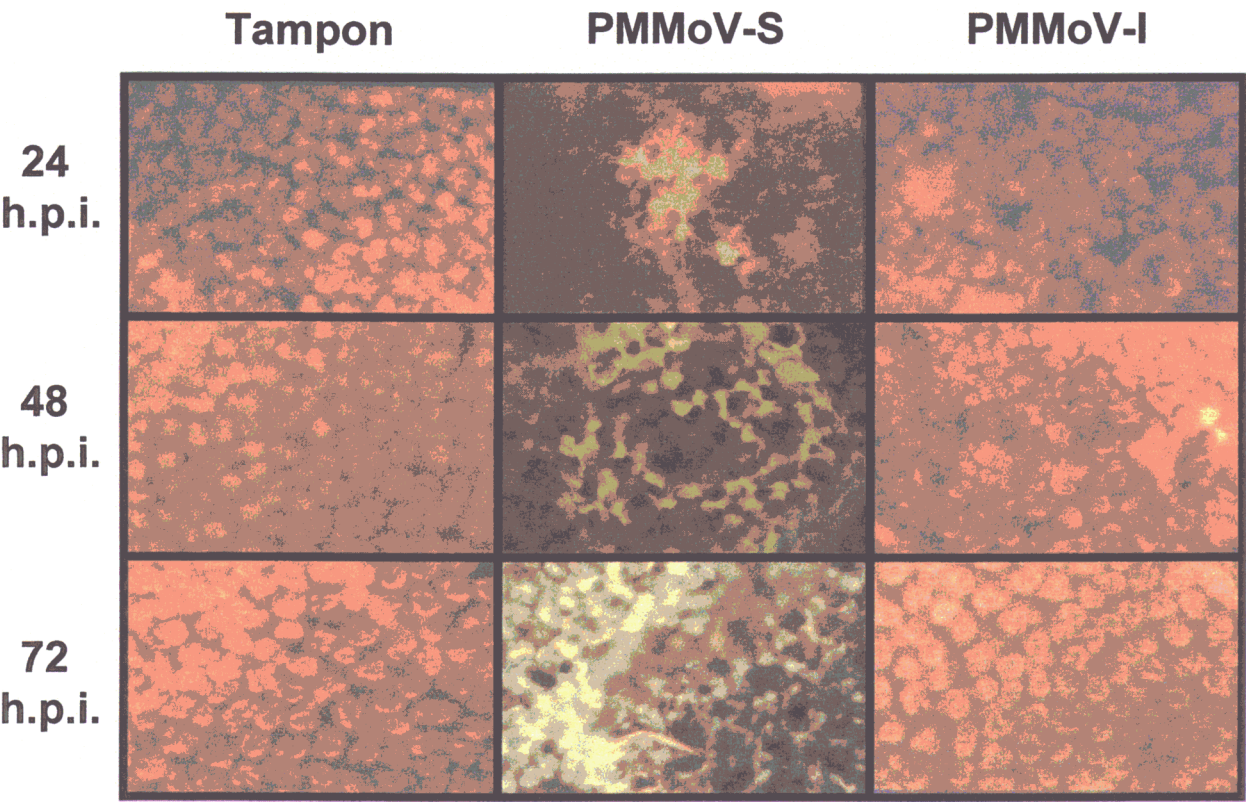


Figura 37. Deposición de compuestos fenólicos de las células de plantas de *C. chinense* inoculadas con los virus y tampón que aparecen en la parte superior de la figura. Las muestras fueron recogidas a los tiempos post inoculación que se indican en el lateral de la figura.

muerte celular fue exponencial entre las 8 y las 16 h.p.i., y luego se estabilizó hasta las 48 h.p.i.

En las muestras de plantas inoculadas con PMMoV-I hay un ligero incremento a las 8 horas y se mantiene prácticamente constante hasta las 24 h.p.i., produciéndose entre este tiempo y las 36 h.p.i. una reducción hasta llegar a un valor de cero.

Por tanto, la muerte celular en plantas de *C. chinense* inoculadas con PMMoV-S, medida como incremento en la captación del colorante azul de Evans por las células, comienza a las 8 h.p.i. y continúa hasta las 48 h.p.i., mientras que en las inoculadas con la cepa PMMoV-I no se aprecia muerte celular en los tiempos analizados.

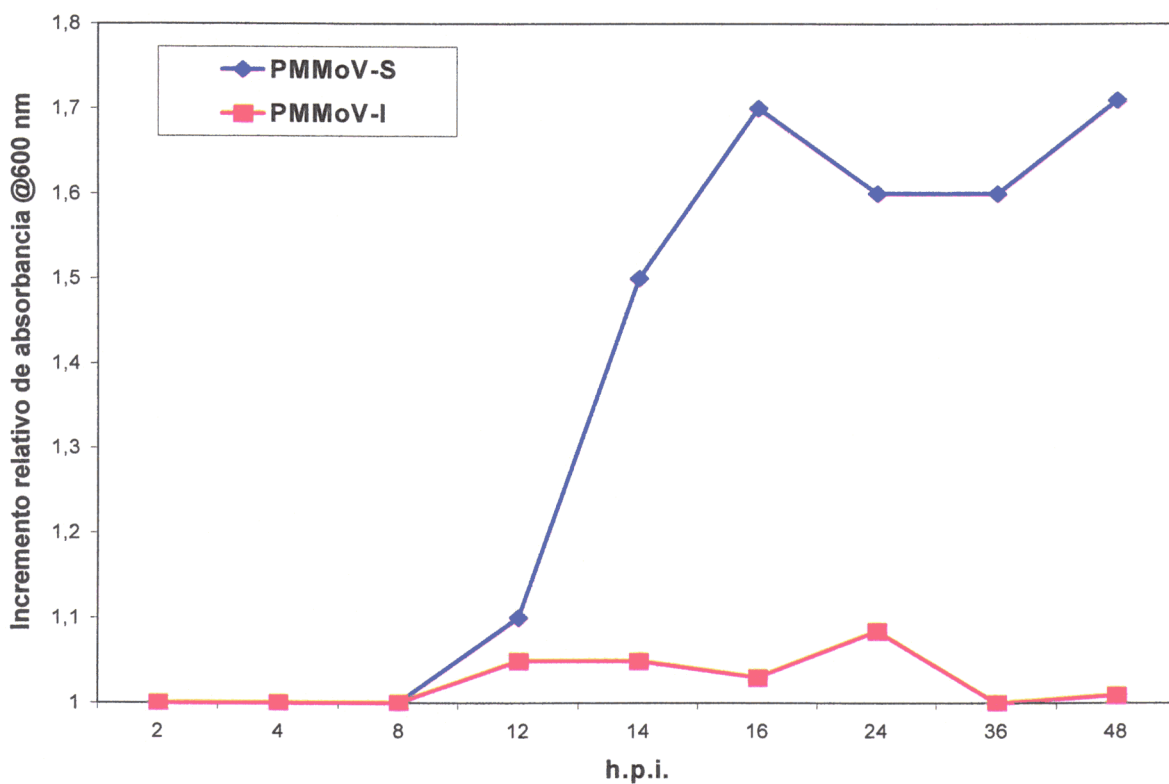


Figura 39. Análisis de la inducción de la muerte celular en plantas de *C. chinense* infectadas con PMMoV-S y PMMoV-I medido como la capacidad de las células inviables de acumular el colorante azul de Evans. Los resultados de las muestras infectadas por los virus se refiere a los obtenidos en cada tiempo en las plantas inoculadas con tampón, considerando éstas con un valor absoluto de 1.

III.2.2.4. Análisis de los cambios en los ARNs mensajeros inducidos en plantas de *C. chinense* en respuesta a la infección por las cepas española e italiana de PMMoV

Para realizar una caracterización parcial de la respuesta del huésped durante la activación de los mecanismos de defensa de la planta se analizaron las alteraciones que sufre el patrón de expresión de los ARNs mensajeros del huésped en plantas de *C. chinense* durante interacciones compatibles e incompatibles, con objeto de identificar factores de resistencia del huésped inducidos en las primeras etapas de la respuesta vegetal. Para llevar a cabo estos análisis se utilizó la técnica de "differential display" (Liang y Pardee, 1992).

El estudio se realizó utilizando muestras de ARN total de hojas inoculadas de plantas de *C. chinense* con la cepa española de PMMoV inductora de la resistencia y con la cepa italiana que sobrepasa dicha resistencia. Para los ensayos se inocularon diez plantas con cada virus y para minimizar la respuesta de defensa de cada planta, se extrajo el ARN de una mezcla de HI procedentes de 5 plantas. Así mismo, se extrajeron dos muestras de ARN independientes en cada caso para realizar el experimento por duplicado y seleccionar aquellos ARN que se indujeran en las dos muestras tratadas de la misma forma.

Los resultados obtenidos mostraron que existían ARNs que se inducían de forma diferencial en las muestras tratadas con ambas cepas de PMMoV (figuras 39 y 40).

Se han aislado 21 bandas diferenciales, 17 bandas aparecían en las muestras en las que existía inducción de la HR y 4 bandas estaban asociadas con la no inducción de la resistencia.

En la figura 41 aparecen las secuencias de los fragmentos correspondientes a los mARN asociados a la reacción incompatible (virus PMMoV-S) (SP y SCP) y a la reacción compatible (virus PMMoV-I) (IP). Como se puede observar los fragmentos obtenidos tienen un tamaño entre las 100 bp y las 415 bp.

Todas las secuencias fueron analizadas en la base de datos BLAST. Tomando el valor de e^{-x} como un índice de similitud con las secuencias de las bases de datos observamos que algunas de las secuencias presentan una homología muy baja con algunas aparecidas en las bases de datos en las que el valor e se encuentra por encima de e^{-2}

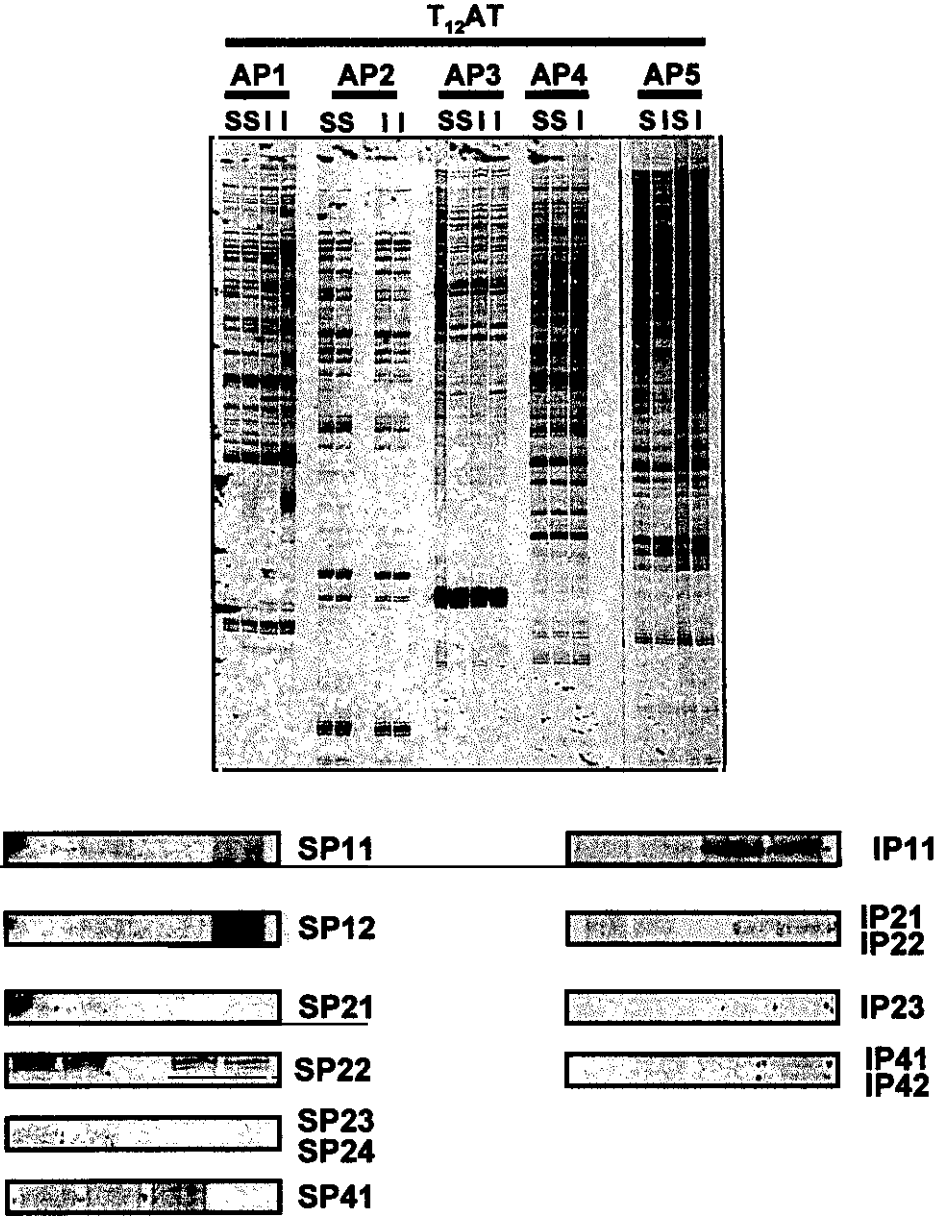


Figura 39. "Differential display" de muestras de ARN procedentes de hojas de *C. chinense* inoculadas con PMMoV-S (S) y PMMoV-I (I). En la parte inferior de la figura aparecen las bandas que fueron aisladas del gel y que aparecían de forma diferencial en las muestras tratadas con los dos virus. En la parte superior de la figura aparecen los cebadores con los que fueron amplificadas las bandas.

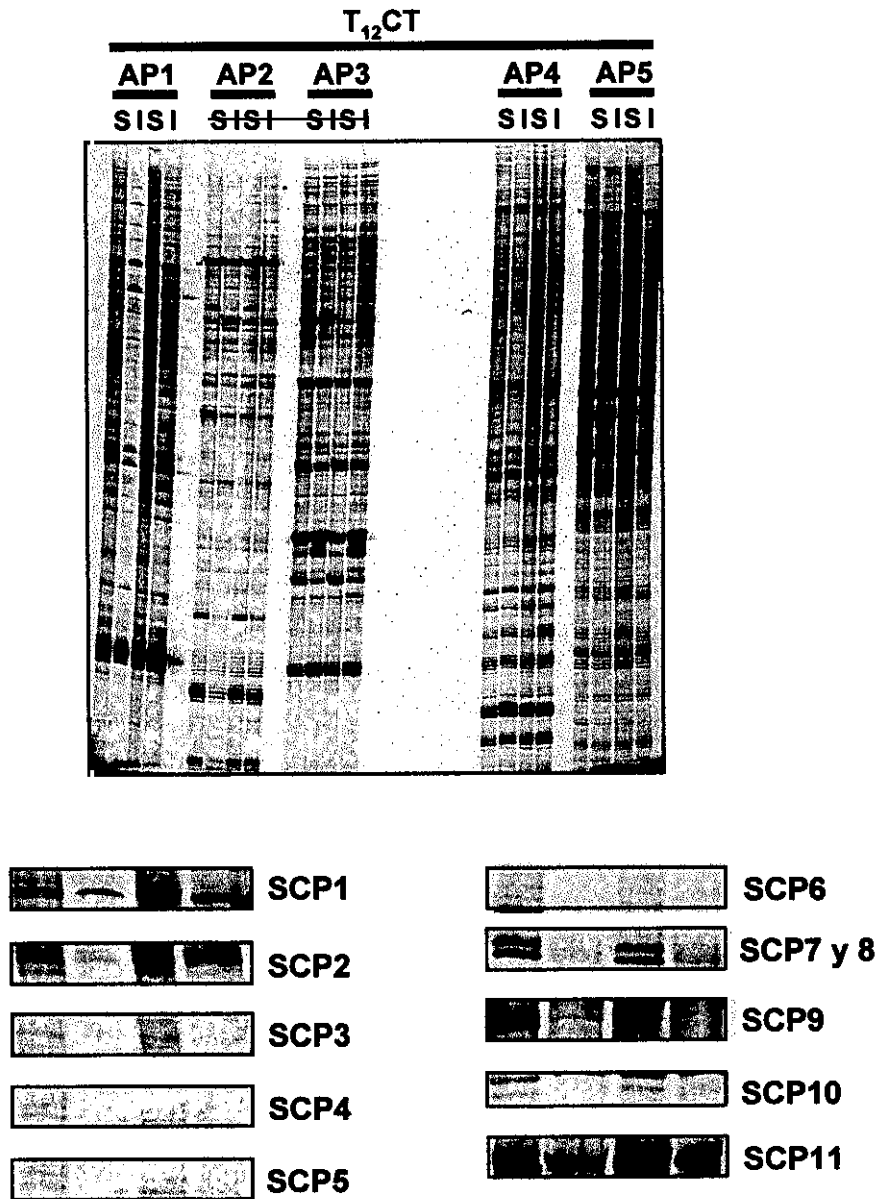


Figura 40. "Differential display" de muestras de ARN procedentes de hojas de *C. Chinense* inoculadas con PMMoV-S (S) y PMMoV-I (I). En la parte inferior de la figura aparecen las bandas que fueron aisladas del gel y que aparecían de forma diferencial en las muestras tratadas con los dos virus. En la parte superior de la figura aparecen los cebadores con los que fueron amplificadas las bandas.

e-2 (Nelson *et al.*, 1997). Por último existe un conjunto de secuencias que no muestran homología con ninguna de las que se encuentran en las bases de datos.

De todos los fragmentos amplificados los que muestran homología con secuencias de moléculas que intervienen en procesos de resistencia: SP11 con la ω -3 desaturasa de ácidos grasos, SP23 1-aminociclopropano carboxilato oxidasa, SP24 citocromo oxidasa mitocondrial, y las SCP9,10 y 11 con la S-adenosilmetionina descarboxilasa.

III.2.3. Inducción de resistencia adquirida en *C. chinense*

Asociada a la respuesta hipersensible en ciertos huéspedes se desarrolla el fenómeno que se conoce como resistencia localizada y sistémica adquirida. Debido a esta resistencia el tejido que circunda a las lesiones locales necróticas desarrolla resistencia a la subsiguiente infección por el mismo virus o por otro virus no relacionado. Para el estudio de este fenómeno de resistencia adquirida en plantas de *C. chinense* se utilizó como virus inductor la cepa S de PMMoV y como virus desafiante un virus no relacionado con el mismo perteneciente a otro grupo, el potexvirus PVX.

Para estudiar si existía resistencia local inducida en plantas de *C. chinense*, las plantas se inocularon con PMMoV-S como virus inductor y a distintos tiempos post inoculación (0h, 24h y 48 h) se inoculó el virus desafiante (PVX). Las plantas se mantuvieron durante 15 d.p.i. y se analizaron por "Western Blot" y ELISA las HI y las HS tanto a los 7 d.p.i. como a los 15 d.p.i. para detectar ambos virus en las muestras.

Como se observa en la tabla VI cuando los dos virus se inocularon al mismo tiempo todas las plantas analizadas fueron infectadas por PVX. También se analizó la presencia de PMMoV-S en HI y en HS y en estas últimas nunca se detectó la presencia de este virus. Los síntomas desarrollados en estas plantas fueron los siguientes: desarrollo de LLN a los 4-5 d.p.i. y posteriormente una necrosis generalizada tanto en las HI como en las HS. Los síntomas de LLN fueron similares a los desarrollados en las plantas inoculadas sólo con PMMoV-S y los síntomas de necrosis fueron similares a los desarrollados en las plantas inoculadas sólo con PVX.

SP11

5'GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGCGGCCGCGAAGTATCTTTTTGTAAATAATCATTTTCAGAATCCAGAATAC
AGATAATATACTTTCTTGGCCAACCCAAGATAAGGCCCTGAAGACAATAATTGAACTTGCTCTTTTCTAATGGCAG
GTAGCTAACTTTACTTTGTGCTCAACCAGTAGTGCTTATACAACCAACTTGAATGGATGGGGCATGGCCATAGTGTT
AGTGAAAAAGAATCAGCTAACAGGGTTTTGCTATTTCTCAAAAAAAAAAAAAA3'

SP21

5'GCTTGTTATTGAATTGGACGAAATGGGTCCCCAAGGACCACAGCTGCAGAAAGTGCTGGAAAGGCTTACTGGAC
AACATACAGTTCCCAATGTGTTCAATGGGGCCAAACACGTTGGTGGCTGTACAGATACTATTAAGCTGTATCGGAA
AGGAGAACTTGAATCTTTGCTATCAGAAGCTAATCCTGGAAAAACAGAAAGCTAGGACATCTTGATCTATCCATGCC
AAAGAGATCCTATCTCATGCCGTCCTTGACGCATTATTCTTCCAGATTTCTTTGACATATTCACATATCATTATGTT
GTTCTTTACAAGTATATCTTGCTTCTGATTGTAACCTCAATGTTGAAGCAGGTAGCTATGTTGATACAACCTTCATT
ATGAGTTTATACTGAATTTTCTCCTTCTCAAAAAAAAAAAAAA3'

SP22

5'CGCTTGTAAGTGGCAAGGGAATAGAAGTGACGTACACGTGATCTATGAGTGCGCTCAACTCCTACTTGAAAA
GAGTGTACGGTAACCACCATGTAGTAATTATATTTCTGTGTTGAGATAATTCATTCTCTTCCCTTCACTTCAGCCCA
CATCATACGGGGAAGTAGTAAAGGAAAGGGATTCTCTCTCTCAAAAAAAAAAAAAA3'

SP23

5'GACACCAATGTCTTCATTAAGTCTAGCATATCTCAAAATTTCTAGAATGGAGTCTAGCAATGGGTTATTGATTTAAAT
ATTGCTAAGCTTGGTGAGGAACCTTCTTGATTTTGGATTATCCTCCTTTTCTTGAGTATTTGAGAAAATGGAGAAGG
GATTTTCATTAGATACAAGCGAAAAA3'

SP24

5'CGCTTGTAATATCACAATAACTAAAGGAGCCAAGCAACGAAGCAACAGTGTCTCGAAGTTTGACAAAACCTT
TAATTTGTTAGAGCATTTATCGGAGGAATTTCTTATTTACTAATAAAATCACAAGGAAGAAGAAATCCAAGCAGAGA
GAGAGAGTGCCTCTTATACCCTC AAAAAAAAAAAAAA3'

SP41

5'CGCATGTAAACATCACAATACTAAAGGAGCCAACCAACGCAGCAACAGTGTCTCGAAGTTTGACAAAACCTT
TAATTTGTTAGAGCATTTATCGGAGGAATTTCTTACTTACTAATAAAATCACAAGGAAGAAGAAATCCAAGCACAGA
GAGAGAGTGCCTCTTATACCCTCAAAAAAAAAAAAAA3'

SCP1

5'AATGTATTCGACTCGCCATTTGGCGAGCAAGCTCGGTAACCGGGGATCCTCTAGAGTCACCAGCGAAGAAAGTT
GAAAAGATGGTGTGCTTTTGAAGCTCCTGCATCTACCTCCTGTCTATTATTTTTTATTGACTGTCTCTCTTGGGT
GGGGGGGCGAGTGTTGTGAAATCATTAGGACCAGACTGGTCAGTCAATTTTGATATGCTGAATAAAACAGTAACATT
CCATAATGTATATGAATAATTGCTTAGATAGATATAAGTTGTGTATTCCTTTGAAAGTATTACAGATTGCAGTTTGA
GAGCTTATACAACATAGTGAAACGTATATTGCAAAAAAAAAAAAAA3'

SCP2

5'GCCAAGTTGAGTTAGTGCAAATTTTGGGTAAGATCAGTAGCATTCCCTTGTCATATCATTTTCGATAATGGAATTA
GAGTACATTCTCACAACCAAAGCGGTAAAAAACTGGCCTTGCCCTTATCTCTATCAGATATCAGGAGTTTCTTGG
GTTTCGCTGGAGCCAGCGAAGAACCATACACACCATACCTCAACACAACCACATAGAATACCAAATTAATTGAACTA
AACCTAGAAGGCAACACCAATTCAACTTTCAATCCCCAGAGACACATTACTAAGAGAGCCAGAGTGTATCTATACA
CTAATTCCTTGTTCAAGCCTAGCAAAAAAAAAAAAAA3'

SCP3

5'GCGGGAACGACTTATGATAGAATCCGCCTTGTTTATCTTGACGAAATGGGCGGAACAGCTATTCCAAGGCCAAAA
ATGTTACAGACGTTCACTACCTTTTCGCTGGCTGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTA
ACTTCGACCTTGGCGTAATCATGGTCATAAAAAAAAAAAAAA3'

SCP4

5'GTGACCGCTTGTTGAGTTGATATATTTAGTAAATAAAAGTGTGCTCTTCTAACAACCTTAAGTTTTTGGATGAGAT
GGTCACACTTTAAACATTCTCAGATCAAGGACCAAAATGAGTTGTGATGTCTCTTAGGCATTGAGCTAGCTCAATAT
AGATCTGCCTTTGTGAGTTTACAACATATGTATATTCTTGACGTCCATGAGGAGATAGGGTGAGAGATTGTACATGT
AATGATGCTCGCCTGGATCCAGACGTTAAGCTCTTACTAGGTTTGGGATGCTCTTAGTGATTGCAAAAAAAAAAAAAA
A3'

SCP5

5'TGCGGGAACGACTTATGATAGAATCCGCCTTGTTTATCTTGACGAAATGGGCGGAACAGCTATTCCAAGGCCAAA
AATGTTACAGACGTTCACTACCTTTTCGCTGGCTGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTT
AACTTCGACCTTGGCGTAATCATGGTCATACCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCCCACAATTCCACACAACA
TACCACCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCGAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTC
ACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCAAAAAAAAAAAAAA3'

SCP6

5'GCAATCACTAAGAGCATCCCAAACCTAGTAAGAGCTTAACGTCTGGATCCAGGCGAGCATCATTACATGTACAAT
CTCTCACCCCTATCTCCTCATGGACGTCAAGAATATACATATGTTGTGAACCTGACAAAGGCAGATCTATATTGAGCTA
GCTCAATGCCTAAGAGACATCAAACTCATTTTGGTCCTTGATCTGAGAATGTTTAAAGTGTGACCATCTCATCAA
AACTTAAGTTGTTAGAAAAGAGCACACTTTTATTTACTAAATATATCAACTCAACAAGCGGTCAAAAAAAAAAAAAA3'

SCP7

5'GCAGTGTATGCTATCTTTGCCCTTTGCTTGATGCATTGTAATGCATTCCCTTTATCATTTACGCACTGCATTTTATTC
CTGCCCTTTACTTGCACACACATGTAATACCCAGTATTTTCGTGCTAAAATTCTAACCGTCGTTCCCTACGCGTCTAAG
CTCTAATCCAAGAGATTCTCATGTGAATACAAGTTTCAGTGATATTTATCCTTATGTTTGATTTGTGTTTGAGGTTAA
AAATGTTCTTAAGATCATTTGATTTGTCCAAAATTCGATATTCGATTCTACAATCCGGTCGACAAAAAAAAAAAAA3'

SCP8

5'TGCCAAAAGTACGGTGAGAACTGCGTTTCTCGATTAGATATGATAGGGACTAGAGCACCACACAATTTGATGATC
TCCTGAATGAAAAGCTTAGCATAATCCTCCGCAAAAAAAAAAAAAA3'

SCP9

5'GACCGCTTGTGTGCAAATCTGAACTAGTTTAGTCTTTTGGTGTTCACCAGAAGCCTTGTGTGTCTGCATTTTGA
ATTGTTTCTGTTGGTTGTCTCTTCAGTTGTCTAATAAAAGTTTGTGTGTGCAAAAAAAAAAAAAA3'

SCP10

5'AAACCGCCCCAGTTAATGGACCACGACTCACTAAAAGGGCGAATTCCAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAG
TCGTGCAAATCTGAACTAGTTTAGTCCTTTGGTGTTCACCAGAAGCCTTGTGTGTCTGCATTTTGAATTGTTTCC
TGTTGGTTGTCTCTTCAGTTGTCTAATAAAAGTTTGTGTGTGCAAAAAAAAAAAAAA3'

SCP11

5'GCACACAACAACTTTTATTAGACAACCTGAAGAGACAACCAACAGGAAACAATTCAAAATGCAGACACACAAGGC
TTCTGGTGAAACACAAAAGACTAACTAGTTCAAATTTGCACACAAGCGGTCAAAAAAAAAAAAAA3'

IP11

5'GAGCAAATTGAAATTAAAGAATAACTGAAAAACCAGAACTCAACATATAACACACAGATTCATCATTAGGAAATTCT
CATAACTTGGTTGGAATGGAGGAAAATACACCGGTACACGCCGAAAAATAACAAAGGACAAAAACGTACTTTCTG
AAAGGGGTAAAAAAGACTACGTACAAATCACACATACATCTCCATATGAGGGGTAATTATATGTTGCTGGCTAAA
AAAAAAAAAAAAA3'

IP22

5'CACAAGCAAGCAACATGTATAAGCCACATGTTGAAAAGATAAACATACTTTAGTAAAATAGTACTGACAATTATT
GATGTATTCACTAAAATAATAAATGGAAGTCAAATTGCAATTCAAAGGACTTACACAACCAATATAATTATAAGAT
ACTTAAACATCAACACTCTATCCAAATTTCTCTAATGAAATACACAAGAGAGAATAGTCAAAAAAAAAAAAAA3'

IP23

5'GACAAGAAATGCCATCTCATTCTCAAAATGATGATCCAAATATCTCTACCTAGTTACAAAATACGGTAAATTC
CCATATACGTGAATCATTTCCACATCATTAAATTTCTACAAGCGAAAAAAAAAAAAA3'

IP41

5'GACAGCACTGAAATTTTCTTCATTGTACTCATCGATTGGCTTACAGCAGATGATAGTCCAGATAGAGTCTCCAA
ATTAATCAACATGTGATATTGTAGTAAGATTATATAATGACAATGCGAACAACTTTCCAATTTAAAAAAAAAAAAA3'

Figura 41. Secuencias de los cADN o su complementaria correspondientes a los mARN inducidos de forma diferencial en plantas de *C. chinense* inoculadas con PMMoV-S (los denominados SP y SCP) o con PMMoV-I (los denominados IP).

Tabla V. Caracterización de las secuencias de los clones de cADN obtenidos a partir de los mRNA inducidos de forma diferencial en plantas de *C. chinense* inoculadas con la cepa española (clones denominados SP y SCP) o con la cepa italiana (clones denominados IP).

Nombre	Longitud	Secuencia	Origen de la secuencia	% homología DNA / valor e	% homología proteínas/valor e
SP11	271	ω -3 desaturasa de ácidos grasos	<i>Nicotiana tabacum</i>	75 / $1.9e^{-54}$	98 / $1e^{-22}$
SP21	415	Glutarredoxina	<i>Arabidopsis thaliana</i>		67/5e ⁻²⁰
SP22	194				
SP23	175	1-aminociclopropano 1-carboxilato oxidasa	Guisante	63 / 0.12	
SP24	176	Citocromo oxidasa mitocondrial			50 / 0.95
SP41	176	Dihidropicolinato sintasa		67/0.048	
SCP1	338	Citidina deaminasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>		29/4.1
SCP2	331	Poli(proteína)			
SCP3		NADH plastoquinona oxidoreductasa de cloroplasto	<i>Nicotiana tabacum</i>		76/8e ⁻¹²
SCP4	295	Proteína 4 de transposon Tst1	<i>Solanum tuberosum</i>	38/1.1	
SCP5		Sin homología			
SCP6	292	Sin homología			
SCP7	295	Sin homología			
SCP8	107	Sin homología			
SCP9	130	S-adenosilmetionina descarboxilasa	<i>Solanum tuberosum</i>		
SCP10	195	S-adenosilmetionina descarboxilasa	<i>Solanum tuberosum</i>	87/2e ⁻¹⁴	
SCP11		S-adenosilmetionina descarboxilasa	<i>Solanum tuberosum</i>	87/3e ⁻¹⁵	
IP11	227	RbcS3 ribulosa 1,5 bifosfato carboxilato oxidasa	<i>Solanum tuberosum</i>	87 / 4e ⁻⁰⁹	
IP22	213	Subunidad F NADH deshidrogenasa	<i>Paeonia anomala</i>	35 / 1.0	35/1.4
IP23	121	Antocianidina sintasa		64/0.35	
IP41	140	Prepenato deshidrogenasa	Levadura	34 / 9.3	

La aparición temporal de síntomas inducidos cuando se inoculaba PVX inmediatamente después de la inoculación desafiante y cuando PVX se inoculaba después de la inoculación con tampón, fue similar, a los 7 d.p.i. existía una necrosis generalizada en las HI, a los 10 d.p.i. existía una clorosis en las HS que se tornaba en necrosis a los 15 d.p.

Se analizaron las HI a los 7 d.p.i. y las HS a los 15 d.p.i. para determinar el desarrollo de la infección de PVX en las plantas y detectar la CP del virus. La proteína de cubierta de PVX se detectó en todos los casos. Así mismo, las concentraciones de PVX en HS de las plantas inoculadas sólo con PVX y en aquellas inoculadas con ambos virus eran similares (tabla VI).

Tabla 1. Número de plantas infectadas y acumulación viral de PVX en plantas de *C. chinense* previamente inoculadas con tampón o con PMMoV-S 0 horas antes de la inoculación desafiante. (1) ng/mg tejido \pm error estandar.

INOCULACION "INDUCTORA"	INOCULACION "DESAFIANTE"	PLANTAS INOCULADAS/INFECTADAS	VIRUS "DESAFIANTE" EN HS (1)
Tampón	PVX 0.1 μ g/ml	5/5	91.86 \pm 21.87
Tampón	PVX 2 μ g/ml	5/5	83.07 \pm 21.91
PMMoV-S 20 μ g/ml	PVX 0.1 μ g/ml	5/5	69.09 \pm 3.41
PMMoV-S 40 μ g/ml	PVX 2 μ g/ml	5/5	73.38 \pm 18.7

Cuando entre las inoculaciones inductora y desafiante transcurre un periodo de tiempo de 24 horas, observamos que se inducen en HI las LLN debidas a PMMOV-S a los 4-5 d.p.i.. Posteriormente se desarrolló necrosis sistémica en la mayoría de las plantas inoculadas con PVX. En las plantas inoculadas previamente con tampón o con PVX sólo, se produce la necrosis sistémica en todas las plantas inoculadas (tabla VII).

Cuando se analizaron las concentraciones de PVX por ELISA-DAS se observó que la concentración de este virus en HI de las plantas inoculadas 24 horas antes con PMMoV-S era similar a la observada en las plantas inoculadas con tampón. En HS la concentración de PVX era sensiblemente inferior en las plantas inoculadas 24 horas antes con PMMoV-S, entre un 30 y un 50% menos que las plantas inoculadas

previamente con tampón. Así mismo, no existía diferencia en la acumulación de PVX en HS en las plantas inoculadas con diferentes concentraciones del mismo virus.

Cuando el intervalo entre la inoculación con el virus inductor, PMMoV-S, y el virus desafiante, PVX, fue de 48 horas, ninguna de las plantas inoculadas previamente con el virus inductor, mostraron infección sistémica por PVX, mientras que todas las plantas inoculadas con tampón y posteriormente con PVX fueron infectadas sistémicamente (tabla VIII y figuras 42 y 43).

Tabla VII. Número de plantas infectadas y acumulación de PVX en plantas de *C. chinense* inoculadas con tampón o con PMMoV-S 24 horas antes de la inoculación del virus desafiante.
(1) ng/mg tejido ± error estandar

INOCULACION "INDUCTORA"	INOCULACION "DESAFIANTE" 24 HORAS	PLANTAS INOCULADAS/INFECTADAS	CONCENTRACION VIRUS "DESAFIANTE"
Tampón	PVX 0.5 µg/ml	5/5	67.79 ± 24
Tampón	PVX 1 µg/ml	5/5	95.07 ± 15.4
PMMoV-S 40 µg/ml	PVX 0.5 µg/ml	5/5	49.025 ± 11.4
PMMoV-S 40 µg/ml	PVX 1 µg/ml	4/5	47.53 ± 2.7

Cuando se analizaron las HI y las HS de dichas plantas la proteína de cubierta de PVX de detectó únicamente en las HI (figura), en ningún caso de las membranas se observó la presencia de la CP de PVX en HS.

Tabla VIII. Número de plantas infectadas y acumulación viral de PVX en plantas de *C. chinense* 48 horas antes inoculadas con tampón o con PMMoV-S de la inoculación del virus desafiante.

INOCULACION "INDUCTORA"	INOCULACION "DESAFIANTE" 48 HORAS	PLANTAS INOCULADAS/INFECTAD AS
Tampón	PVX 0.5 µg/ml	5/5
Tampón	PVX 1 µg/ml	5/5
Tampón	PVX 2 µg/ml	5/5
PMMoV-S 40 µg/ml	PVX 0.5 µg/ml	0/5
PMMoV-S 40 µg/ml	PVX 1 µg/ml	0/5
PMMoV-S 40 µg/ml	PVX 2 µg/ml	0/5

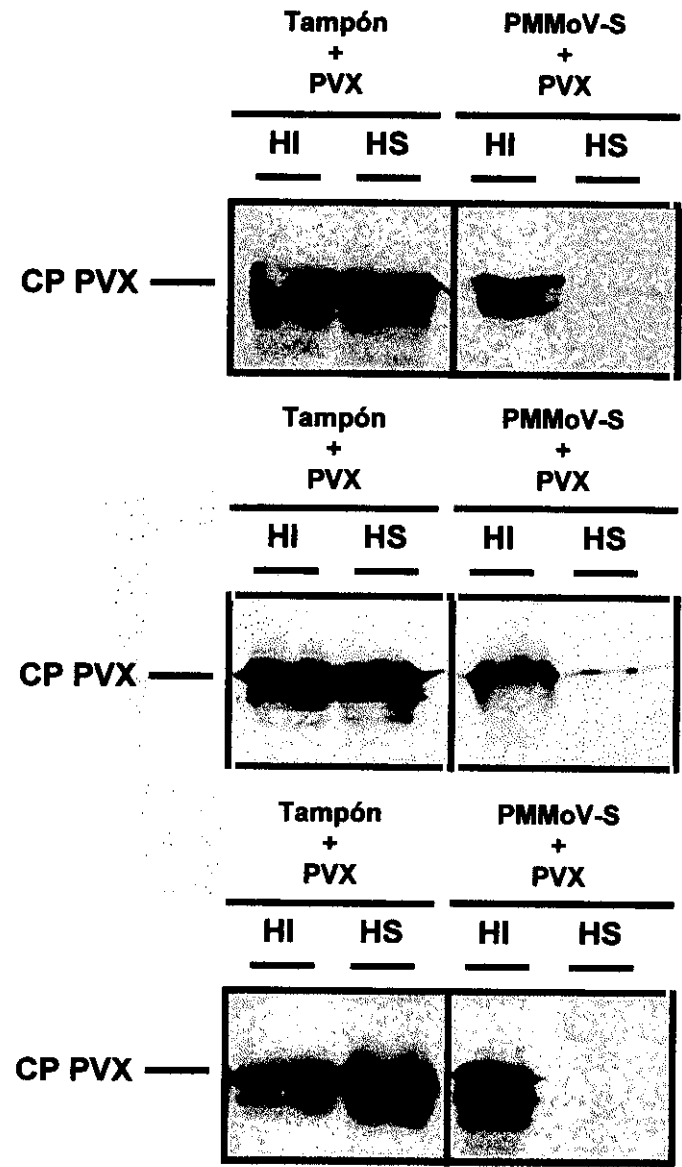


Figura 42. Detección de la CP de PVX en plantas de *C. chinense* inoculadas con PMMoV-S y tampón 48 horas antes de la inoculación con 0.5 µg/ml (figura A), 1 µg/ml (figura B) o 2 µg/ml (figura C) de PVX.

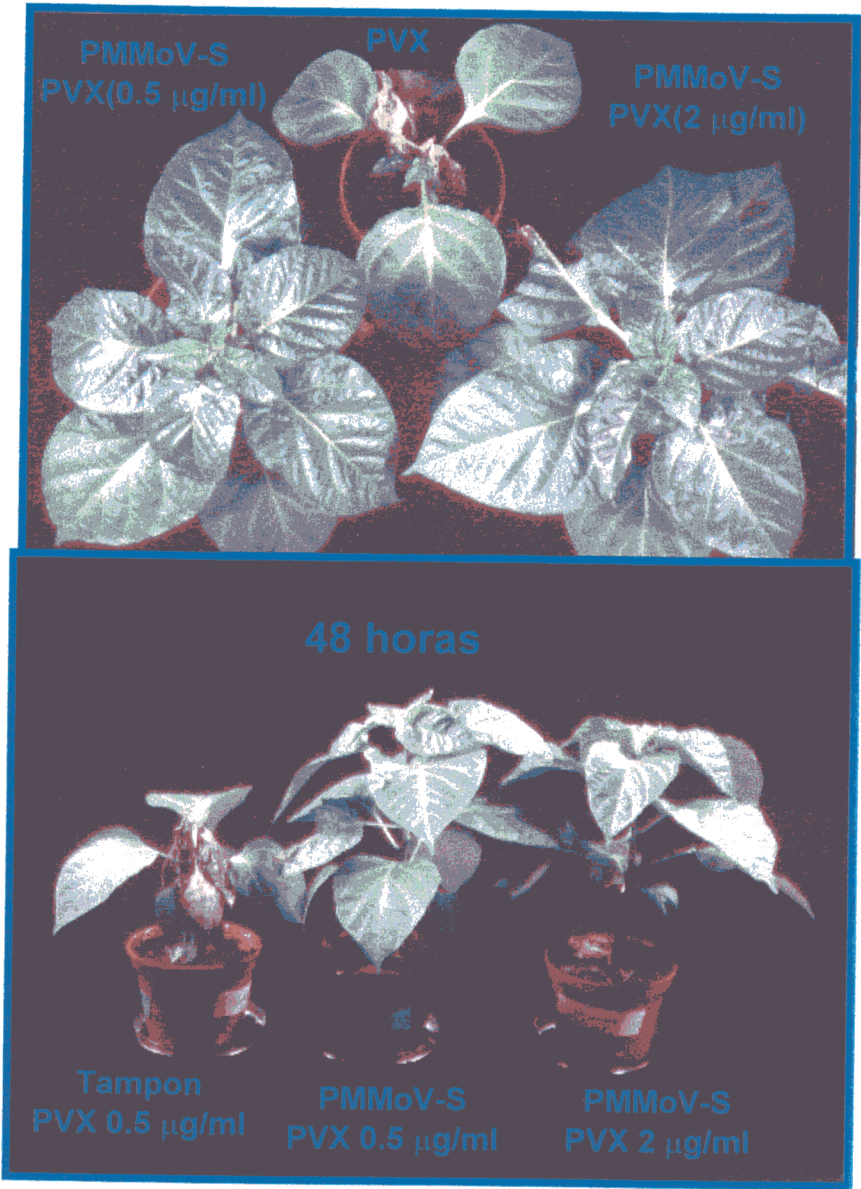


Figura 43. Síntomas desarrollados a los 15 d.p.i. en plantas de *C. chinense* inoculadas con PMMoV-S a 40 µg/ml o con tampón 48 horas antes de la inoculación del virus PVX a las concentraciones indicadas

Se analizó también si en este huésped la resistencia adquirida se induce en hojas distantes del sitio de inoculación del virus inductor. Así se inocularon plantas de *C. chinense* con tampón y con PMMoV-S y entre los 3 y 7 d.p.i. se inocularon las hojas inmediatamente superiores a estas con el virus desafiante (PVX). A los 7 días posteriores a la inoculación desafiante se recogieron muestras de las hojas superiores

y se procesaron para analizarlas por Western Blot. Como se observa en la figura 44 todas las plantas analizadas mostraron infección en las hojas superiores. El nivel de acumulación de la CP de PVX es independiente del intervalo de tiempo transcurrido entre la inoculación inductora y la inoculación desafiante.

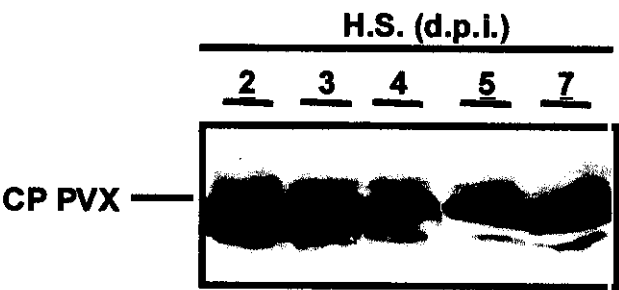


Figura 44. Detección de la proteína de cubierta de PVX en HI con este virus en plantas que habían sido previamente inoculadas con PMMoV-S a los días indicados en la figura en el piso inmediatamente inferior.

DISCUSSION

Se conoce desde hace más de 50 años que los genes de resistencia en plantas tienen un gen complementario en el patógeno denominado gen de avirulencia (Flor, 1942). En 1942, Flor, estableció que a cada gen de resistencia en el huésped le corresponde un gen de avirulencia en el microorganismo patógeno. Esto llevó a proponer un modelo de complementariedad gen a gen (Flor, 1956; Gabriel y Rolf, 1990; Keen, 1990) para explicar las interacciones incompatibles planta-patógeno (Keen, 1992). El clonaje de estos genes de avirulencia y de los correspondientes genes de resistencia es lo que ha proporcionado la prueba genética definitiva de su función en el reconocimiento del patógeno por el correspondiente gen de resistencia de la planta (Schofield et al., 1996).

En trabajos anteriores, Berzal-Herranz *et al.* (1995) y De la Cruz *et al.* (1997), determinaron que las proteínas de cubierta de PMMoV-S y PaMMV eran requeridas para la inducción de la HR mediada por los genes L^3 y L^2 respectivamente, pero quedaba por determinar si en la inducción de la HR por tobamovirus, en plantas del género *Capsicum*, participaban otras regiones del genoma viral u otros procesos asociados al ciclo de replicación del virus. Así pues nos propusimos determinar si las CPs de PaMMV y PMMoV eran capaces por sí mismas de inducir la resistencia en plantas de pimiento portadoras de los genes de resistencia de la serie alélica L (L^2 , L^3 y L^4).

Se han clonado las proteínas de cubierta de tres tobamovirus pertenecientes a los patotipos P_1 (PaMMV), $P_{1,2}$ (PMMoV-S) y $P_{1,2,3}$ (PMMoV-I) en dos vectores de expresión transitoria en plantas pPC2S (Chapman *et al.*, 1992) y pMJD82 (Dowson Day, 1994). Uno de ellos es el vector pPC2S, derivado del virus PVX. La expresión de las CP de los tobamovirus en este vector está dirigida por el promotor de la CP de PVX.

En 1992 Chapman *et al.* desarrollaron un vector de expresión transitoria en plantas, como una alternativa a la transformación. Este vector permite una rápida y fácil expresión de secuencias proteicas. La base del vector viral pPC2S es el potexvirus PVX, miembro tipo de la familia (Koenig y Laseman, 1989). Este vector ya se ha utilizado anteriormente para expresar posibles moléculas inductoras de la resistencia en diferentes huéspedes (Tobias et al., 1999; Joosten et al., 1997; Culver, 1996; Scholothof et al., 1995; Hammond-Kosack et al., 1995; Rommens et al., 1995).

Las CPs de PaMMV y PMMoV-S fueron clonadas mediante técnicas de PCR a partir de clones preexistentes (Berzal-Herranz *et al.*, 1995; De la Cruz *et al.*, 1997) de forma que no existiera ningún nucleótido adicional en el extremo 5' por delante del ATG inicial de la secuencia codificadora de cada CP y que en el extremo 3' de la secuencia existiera parte de la región 3' no codificadora (UTR) del respectivo virus de forma que favoreciera la eficiencia en la traducción y la estabilidad de los transcritos en la planta (Gallie, 1996; Gallie *et al.*, 1991). La CP denominada CPI fue clonada como una proteína híbrida entre las CPs de las cepas española e italiana de PMMoV. Esta construcción contenía 385 nucleótidos correspondientes al extremo N terminal de la secuencia de la CP de PMMoV-S y 212 nucleótidos de la secuencia correspondiente al extremo C-terminal de la CP de PMMoV-I y al extremo 3' no codificador. La clonación fue realizada al igual que en los otros dos casos de forma que no hubiese ningún nucleótido delante del ATG inicial y con una secuencia no codificadora en el extremo 3'. Esta proteína se clonó de esta forma para expresar en plantas una proteína con mínimas diferencias con la CP de PMMoV-S, virus inductor de la resistencia en *C. chinense* (L3L3) y que contenía la metionina en la posición 138 que hace que la cepa I pueda sobrepasar la resistencia conferida por el gen L³ (Berzal-Herranz *et al.*, 1995).

Los transcritos sintetizados *in vitro* a partir de los clones híbridos pPVX-CP de los tres tobamovirus fueron infectivos en plantas de *N. Benthiana* y en todos los casos se obtuvieron elevados niveles de acumulación de las CPs de PaMMV y de las cepas S e I de PMMoV. La relación existente entre las CPs de los tobamovirus y la CP de PVX determinada por ELISA-DAS comenzaba a descender a partir de los 5 d.p.i. considerando este dato como la pérdida de los insertos de las CPs de los tobamovirus en los sucesivos ciclos de replicación de los virus quimeras. Esto es debido a que

para generar en este vector y obtener un sitio de clonaje duplicaron el promotor de la proteína de cubierta del virus e insertaron dianas de restricción entre las secuencias duplicadas, esto genera una cierta inestabilidad de los virus quimera porque puede existir una recombinación homóloga entre las secuencias duplicadas con la consiguiente pérdida de la secuencia insertada (Chapman *et al.*, 1992). Hay que señalar también que en este trabajo fue necesario utilizar savia de hojas de *N. benthamiana* infectadas como inóculo para las plantas del género *Capsicum*, puesto que los transcritos de ARN de los virus quimeras no fueron infectivos en las plantas de pimiento. Además, el tampón utilizado para inocular los transcritos genera lesiones en



las hojas de plantas de pimiento de tal forma que podría interferir en la apreciación de la inducción de lesiones necróticas por los virus quimera en estas plantas.

La funcionalidad como inductores de la HR de las CPs de los tres tobamovirus presentes en los virus quimera fue ensayada en plantas de *N. sylvestris*. En este huésped la resistencia a tobamovirus está conferida por el gen N' y se ha demostrado que su inductor es la CP de estos virus (Knorr y Dawson, 1988; Culver y Dawson, 1989). PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI indujeron LLN que fueron semejantes en tiempo de inducción y morfología a la de los virus PaMMV, PMMoV-S y PMMoV-I.

En todas las plantas de pimiento (*C. frutescens*, *C. chinense* y *C. chacoense*) todos los virus quimeras fueron también infectivos y la CP de los respectivos tobamovirus fue detectada en las HI de todas las plantas. Así mismo los virus quimeras fueron estables en estos huéspedes no sólo en hojas inoculadas sino también en hojas superiores no inoculadas, ya que las CPs de PMMoV-S y de PMMoV-I fueron detectadas en HS de plantas de *C. frutescens* y *C. chinense* respectivamente. La aparición de LLN se produce a los 4-5 d.p.i. en plantas de *C. frutescens* (L^2L^2) inoculadas con PVX-CPPa, de *C. chinense* (L^3L^3) inoculadas con PVX-CPPa y PVX-CPS, y en plantas de *C. chacoense* (L^4L^4) inoculadas con los tres virus quimera.

La inducción de la HR, en una interacción huésped-patógeno incompatible, va acompañada de la localización del patógeno en los sitios de infección. En el caso de los patotipos P_1 , $P_{1,2}$ y $P_{1,2,3}$ de los tobamovirus y plantas del género *Capsicum* con los correspondientes genes de resistencia de la serie alélica L, los virus quedan localizados en las hojas inoculadas y no se produce la infección sistémica. Igualmente los virus quimera PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI quedaron restringidos a las hojas inoculadas de aquellos genotipos de resistencia en los que inducían la HR. Así se ha determinado que la CP de PaMMV se detecta únicamente en las HI de los tres genotipos (L^2L^2 , L^3L^3 y L^4L^4) y en ningún caso se detectó la CP en HS de dichos huéspedes. Por el contrario, la CP de PMMoV-S, virus capaz de sobrepasar la resistencia conferida por el gen L^2 , puede ser detectada también en HS de *C. frutescens* y la CP de PMMoV-I, virus que sobrepasa la resistencia conferida por los genes L^2 y L^3 , se detectó en HS de *C. frutescens* (L^2L^2) y de *C. chinense* (L^3L^3).

Existe sin embargo una pequeña diferencia en cuanto a morfología y tamaño de las lesiones. Las lesiones inducidas por los virus quimera en las plantas de *C.frutescens* y *C.chinense* son algo más irregulares y mayores que las inducidas por los virus salvajes. Esto puede deberse bien a que los niveles de replicación de ambos tipos de virus (salvajes y quimeras) sean diferentes o a que la expresión de las proteínas difiera en el tiempo de síntesis y los niveles de acumulación, o bien que existan otros componentes virales que refuercen la rápida restricción del virus en los lugares primarios de infección. En las plantas de *C.chacoense* los síntomas desarrollados por los virus quimeras fueron de LLN, mientras que los inducidos por los virus salvajes fueron de necrosis localizada en las hojas inoculadas pero no en forma de lesiones bien definidas. En este huésped los niveles de expresión de la proteína inductora son mayores en el virus quimera y esto podría determinar que la restricción del patógeno fuera más efectiva.

Diferencias en la morfología de las LLN inducidas por la expresión de genes de avirulencia en el vector pPC2S han sido también descritos para la CP de TMV (Dardick y Culver, 1997) y para el gen de avirulencia Avr9 de *Cladosporium fulvum* (Hammond-Kosack *et al.*, 1995). En 1997 Dardick y Culver demostraron que la CP de TMV era el inductor de la HR en plantas de *Solanum melongena* expresando esta CP mediante PVX. En este huésped caso las LLN aparecieron de forma más lenta y eran menos definidas que las inducidas por el virus TMV completo, y lo atribuyeron al resultado de diferencias en los niveles y tiempo de expresión de las CP.

En otros casos en los que se ha utilizado PVX para expresar genes de avirulencia de patógenos también los síntomas inducidos por el gen de avirulencia son diferentes. En plantas de tomate con el gen Cf9 los síntomas desarrollados con la quimera que contiene el gen de avirulencia Avr9 de *C. fulvum* son mucho más severos que cuando dicho gen se expresa en su organismo original (Hammond-Kosack *et al.*, 1995), ya que asociada a la respuesta local, las plantas infectadas tienen un fenotipo de HR sistémica, lo que implicaría que la activación de la resistencia se produciría de una forma más tardía al expresarse el inductor en el vector viral.

Las interacciones huésped-parásito incompatibles mediadas por genes R de resistencia presentan una gran especificidad y se ha propuesto que interacción entre los productos de los genes de avirulencia del patógeno y los genes de resistencia de

la planta es la que determina la especificidad en la interacción huésped-patógeno (Keen, 1992). En el caso de las interacciones entre las CPs de los patotipos de pimiento de los tobamovirus y los genes de resistencia de la serie alélica L del género *Capsicum* existe una interacción específica de cada gen de avirulencia con sus correspondientes genes de resistencia de la serie alélica L. Es decir la CP de PaMMV (patotipo P₁) es capaz de inducir la resistencia en forma de HR en plantas de pimiento con estos genes L², L³ y L⁴. La CP de PMMoV-S (patotipo P_{1,2}) es capaz de inducir la resistencia en plantas con los genes L³ y L⁴, pero no genera ningún tipo de respuesta cuando se expresa en plantas con el gen L², y la CP de PMMoV-I (patotipo P_{1,2,3}) es capaz de inducir la formación de LLN sólo en plantas con el gen L⁴, siendo capaz de sobrepasar la resistencia conferida por los genes L² y L³.

Cuando se utilizaron elevadas dosis de inóculo de los virus quimeras PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI, parte de las plantas del género *Capsicum* inoculadas mostraron síntomas de mosaico o necrosis sistémica.

La necrosis que aparecía en las plantas era la misma y se producía paralelamente en el tiempo a la que se desarrollaba en plantas que sólo eran inoculadas con el virus PVX. En las HS de las plantas que mostraron un fenotipo de resistencia, sólo se detectó la proteína de cubierta de PVX. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chapman *et al.* (1992) y Hammond-Kosack *et al.* (1995). Esto es debido a que en los ciclos de replicación de los virus quimeras pueden existir eventos de recombinación que generarían la pérdida del inserto. Así pues en la savia procedente de plantas de *N.benthamiana* y que sirve como inóculo a las plantas de pimiento existiría una mezcla de vectores con inserto y vectores sin ellos. Estos últimos escaparían a la resistencia que confieren los genes de la serie alélica L y serían capaces de replicarse e infectar las HI y las HS de las plantas infectadas.

Estos resultados demuestran que la presencia de la CP del virus inductor de la HR es suficiente para localizar a los virus quimera PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI en las hojas inoculadas de las plantas portadoras de los correspondientes genes de resistencia L², L³ o L⁴, tal y como sucede con los virus PaMMV y las cepas S e I de PMMoV.

Además indican la especificidad de la respuesta de defensa del huésped ya que los virus quimera sin las secuencias del correspondiente gen Avr de los tobamovirus escapan a la resistencia conferida por los genes L^2 , L^3 y L^4 .

En *C. chinense* (L^3L^3) y *C. chacoense* (L^4L^4) la resistencia se activa tanto por la proteína de cubierta de PaMMV, como por la de PMMoV-S. Estas proteínas tienen una homología del 69,2%. En este sentido Dardick *et al.* (1999) han mostrado que proteínas de cubierta de los tobamovirus con homologías de secuencia del 71, 73 y 37% inducen el mismo fenotipo de HR en plantas de *C. annuum* (L^1L^1). Estas proteínas a pesar de su divergencia en la secuencia, tienen una estructura tridimensional casi idéntica (Namba *et al.*, 1989; Wang y Stubbs, 1994).

Dardick *et al.* (1999) proponen que el reconocimiento del inductor viral por el producto del gen de resistencia depende de características estructurales de la CP y que el reconocimiento por el gen L^1 de pimiento es más tolerante con variaciones en la estructura de las CPs de los tobamovirus que el reconocimiento mediado por el gen N' de *N. sylvestris*. Es por tanto posible que la CP de PaMMV y la CP de PMMoV compartan características estructurales comunes que puedan ser reconocidas por un mismo gen de resistencia.

Para determinar si la expresión de la resistencia inducida por las CP de los tobamovirus en plantas de pimiento era capaz de localizar la infección de estas moléculas de PVX inoculadas junto con los virus quimera, realizamos una serie de experimentos en los que se inocularon diluciones seriadas de los inóculos de *N. benthamiana* en plantas de *Capsicum*. Determinamos que para el caso de PVX-CPa y PVX-CPS la utilización de una determinada dosis de inóculo en la que la relación de la cantidad de CP inductora, 30-60 ng de proteína de cubierta de PMMoV-S/ μ g de proteína de cubierta de PVX y 20-40 ng de proteína de cubierta de PaMMV/ μ g de proteína de cubierta de PVX, era suficiente para inducir la resistencia conferida por los genes L^2 , L^3 y L^4 , y contener la infección del virus PVX residual de los inóculos. Estos resultados podrían ser atribuidos al bajo número de copias del virus vector vacío existentes en el inóculo y que limitaría el establecimiento de una infección sistémica de PVX.

Este fenómeno podría también ser debido a la inducción, por el gen de avirulencia de los tobamovirus, de una resistencia localizada adquirida que determinaría la localización del virus vector en las hojas inoculadas. Como veremos más adelante el virus PMMoV-S induce LAR en *C. chinense* (L³L³) que es efectiva frente al virus PVX.

El desarrollo de los procesos de resistencia se encuentra asociado con la inducción de marcadores de defensa. La inducción de proteínas PRs se ha considerado como un marcador asociado tanto a la HR como a la expresión de resistencia local y sistémica (Van Loon, 1985; Stintzi *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 1991). En 1995 Totado observó que la HR inducida por TMV en HI de plantas de *C. annuum* con el genotipo L¹L¹ está acompañada de la inducción y acumulación de PRs ácidas y básicas de los diferentes grupos. La proteína denominada p16 (16 kDa, pI 8.6) se identificó como una PR1 y es una de las PRs mayoritaria en plantas de pimiento. Para determinar si la expresión de los inductores de la resistencia en plantas de *Capsicum* era suficiente para inducir la expresión de PRs se estudió la inducción de la proteína PR1 básica utilizando un inmunosuero específico de la PR1b1 de tomate, proteína que se induce durante la HR producida por TMV en tabaco (Tornero *et al.*, 1997). Esta proteína tiene un elevado grado de identidad con otras proteínas PR-1 tanto de tomate como de otros huéspedes, por lo que su inmunosuero podría reconocer diferentes miembros del grupo, tanto PR-1 ácidas como básica. Tanto en HI como en HS no inoculadas, se ha determinado que la expresión de esta proteína ha variado según la interacción *Capsicum*-proteína de cubierta de tobamovirus que se estuviese estudiando.

En plantas de *C. frutescens* inoculadas con PaMMV y PVX-CPPa la inducción de la PR-1 es similar tanto en HI como en HS no inoculadas. En HI se produce desde los primeros días después de la inoculación y se mantiene a unos niveles constantes, mientras que en HS se produce a tiempos más tardíos y la acumulación de esta proteína es mayor en plantas inoculadas con el virus que con el virus quimera. Hay que señalar que en HI con el vector vacío también se induce la expresión de esta proteína, aunque está desplazada en el tiempo con respecto a aquellas plantas en las que se está induciendo la HR.

En plantas de *C.chinense* inoculadas con PVX-CPS la inducción de la PR1 en hojas inoculadas se encuentra retrasada en dos días con respecto a las plantas inoculadas con PMMoV-S. En las HI la p14 comienza a producirse en las plantas de *C.chinense* inoculadas con PMMoV-S en las que se induce resistencia a los 2-3 d.p.i. Se observa una fuerte acumulación de la misma hasta los 7 d.p.i. Cuando se analizan los tiempos en los que se induce esta proteína observamos que son similares a los descritos para la inducción de PR1 básicas por TMV frente al gen N en *Nicotiana glutinosa* (Brederode *et al.*, 1991), puesto que hay inducción de la proteína a los 2 d.p.i. y aumenta su concentración hasta los 7 d.p.i. que es el último tiempo en el que se recogió muestra. En el caso de las plantas de tabaco la detección es desde el día 1 pos inoculación, sin embargo hay que destacar que la curva de inducción en este caso es de ARN y la detección de la proteína podría estar un poco desplazada en el tiempo. En hojas no inoculadas no se pudo detectar la presencia de esta PR. El vector vacío sólo es capaz de inducir la expresión de esta PR en HI, a tiempos tardíos y en unos niveles muy inferiores a los encontrados en los otros casos. Un resultado muy similar se obtuvo en plantas inoculadas con la cepa italiana de PMMoV que sobrepasa la resistencia del gen L³ en donde la acumulación de esta proteína no se aprecia hasta los 7 d.p.i.. El que se detecte una apreciable presencia de esta PR a estos tiempos significa que existe una inducción de su expresión asociada con fenómenos de infección y acumulación del patógeno a tiempos tardíos.

En algunas dicotiledóneas la inducción de PRs está estrechamente relacionada con la inducción de lesiones necróticas, tanto si se producen por la HR como si son síntomas de la enfermedad en interacciones compatibles (Ward *et al.*, 1991; Ukness *et al.*, 1992; Ryals *et al.*, 1996). En nuestro caso PVX es un virus que a lo largo de la infección en plantas del género *Capsicum* puede desarrollar síntomas de necrosis y se multiplica hasta alcanzar altas concentraciones. Ambas cosas pueden incidir en la expresión de la proteína PR-1 en las plantas inoculadas con este virus. La acumulación de PRs se puede dar después del ataque de patógenos tanto en reacciones incompatibles como en compatibles (Kombrik y Somssich, 1997; Hammond-Kosack y Jones, 1996).

En plantas de *C.chacoense* inoculadas con PMMoV-I y PVX-CPI la respuesta de inducción de la PR1 por los dos virus ha sido ligeramente diferente. Cuando se inocularon con PMMoV-I se pudo detectar esta proteína desde el día 1 post

inoculación observándose una acumulación creciente hasta el último día en que se recogieron muestras. En estas plantas también se indujo en HS no inoculadas a niveles muy inferiores y sin que exista incremento en la acumulación. Cuando las plantas eran inoculadas con el vector quimera PVX-CPI la PR1 se pudo detectar desde los primeros días y aunque su acumulación crece con el tiempo no llega nunca a los niveles alcanzados con el virus PMMoV-I y además no hay inducción en HS. Cuando se analizaron las hojas inoculadas con el vector la PR1 se induce a tiempos tardíos en HI pero no en hojas superiores no inoculadas.

En otros sistemas de expresión transitoria en plantas también se ha estudiado la inducción de proteínas PRs. Así en plantas de *Nicotiana tabacum* cv Samsun NN cuando se expresa el inductor viral del gen N mediante *Agrobacterium tumefaciens* se induce la expresión de PRs tanto en HI como en HS de las mismas (Abbink *et al.*, 1998). En estas plantas cuando se inoculaba la bacteria con el vector de expresión vacío se inducían localmente tanto la proteína ácida PR-1a como la proteína básica PR-1g. Esta característica ya se había observado plantas de *Nicotiana sylvestris* cuando al infiltrar cepas de *Agrobacterium tumefaciens* se inducía la síntesis local de glucanasas y quitinasas (Schöb *et al.*, 1997).

La inducción sistémica de PRs en reacciones incompatibles se ha demostrado en plantas de tabaco con el gen N inoculadas con TMV, en cuyas hojas superiores no infectadas se acumulan formas básicas y ácidas de PRs si bien lo hacen en menor cantidad que en las HI (Heitz *et al.*, 1994). Esto es lo que se puede observar tanto en plantas de *C.frutescens* inoculadas con PaMMV y PVX-CPPa como de *C.chacoense* inoculadas con PMMoV-I. En *C. chinense* (L3L3) no se observó inducción sistémica de la proteína PR1 tanto en las plantas inoculadas con la cepa avirulenta PMMoV-S como con el virus quimera PVX-CPS. Es interesante señalar que el gen de la PR1b1, cuyo suero utilizamos en los ensayos de detección de la PR1, sólo se induce en HI de plantas de tabaco transgénicas asociada a la HR producida por TMV y no se induce en hojas superiores no inoculadas (Tornero *et al.*, 1997).

Analizando estos datos en conjunto podemos observar que la respuesta de cada huésped es diferente y que aunque en cada uno de ellos la inducción de la proteína PR1 por el virus quimera o el virus salvaje difiere en cuanto a tiempos y niveles de acumulación.

Para el estudio de las CPs de los tobamovirus como inductores de resistencia fuera de todo contexto viral fue necesario el clonaje de las mismas en el vector pMJD82 (Dowson Day, 1994). En este vector los genes que codifican para las CPs están bajo el promotor 35s de CaMV y las proteínas son expresadas de forma constitutiva en la planta. Se llevaron a cabo varios experimentos de expresión transitoria de los inductores para analizar dos componentes de la respuesta de defensa, la muerte celular y la inducción de genes asociados a defensa.

Para determinar si las CPs eran capaces de inducir la HR y la muerte celular programada se utilizó un sistema de expresión transitoria semejante al descrito por Mindrinos *et al.* (1994) y Gopalan *et al.* (1996) para expresar las CPs de PaMMV y PMMoV-S en hojas de *C. frutescens* (L²L²), las CPs de PMMoV-S y PMMoV-I en hojas de *C. chinense* (L³L³) y la CP de PMMoV-I en hojas de *C. chacoense* (L⁴L⁴). El sistema utilizado se basa en la predicción de que la inducción de la muerte celular por la expresión de un inductor de la resistencia, reducirá la expresión de un gen marcador como la β -glucuronidasa, cuya expresión está controlada por el promotor constitutivo 35S, cuando se expresa en la misma célula.

En estos experimentos observamos que a lo largo de los tiempos analizados la actividad GUS disminuye cuando el plásmido pMJD-GUS es coinoculado con los plásmidos pMJD-CPPa en plantas de *C. frutescens*, o pMJD-CPS en plantas de *C. chinense*, o pPMJD-CPI en plantas de *C. chacoense*. Sin embargo cuando es coinoculado con el plásmido vacío o con el vector que expresa la CP no inductora de la resistencia (la CP de PMMoV-S en plantas de *C. frutescens* o la CP de PMMoV-I en plantas de *C. chinense*), esta actividad se incrementa con el tiempo. De acuerdo al sistema utilizado, en las hojas transfectadas con el gen Avr la disminución de la actividad GUS se debe a la inducción de la muerte celular en las hojas en las que se está desarrollando la resistencia. Esta muerte celular ya comienza a visualizarse a las 16 h.p.i. en todos los casos y es patente a las 24 h.p.i., ya que en ninguna de las hojas transfectadas puede detectar actividad glucuronidasa a este tiempo.

La reducción de la actividad GUS no puede deberse a modificaciones post-transcripcionales puesto que esta actividad es detectable cuando el gen de la β -glucuronidasa es expresado bajo la acción del promotor gn1 perteneciente a la β -

1,3-glucanasa de *N.plumbaginifolia*, por lo que la reducción se debe sólo a la reducción en los niveles de transcripción de genes bajo promotores constitutivos en aquellas células en las que se está desarrollando la muerte celular.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Gopalan *et al.* (1996) al expresar el inductor AvrB en plantas de *Arabidopsis* en las que induce la resistencia y a las 24 horas postransfección no detectan actividad GUS o lo hacen a niveles muy bajos. Malcuit *et al.* (1999) realizaron experimentos similares para determinar si la proteína de movimiento de PVX es el inductor del gen Nb en patata. En este caso la actividad GUS se reduce entre los días 1 y 2 post bombardeo.

A los 3-5 d.p.b. la expresión de la CP de PMMoV-S en hojas de plantas de *C.chinense* induce el desarrollo de LLN que abarcan espacios multicelulares. Esta HR es inducida de forma específica por la CP de PMMoV-S puesto que en las hojas transfectadas con la CP de PMMoV-I o con el vector vacío no se produjeron. El hecho de que las LLN comprendan más de una célula puede ser debido a que, como resultado de la expresión de la CP de la cepa avirulenta del virus en las células transfectadas, se activan los mecanismos de resistencia de la planta. En estos mecanismos existen moléculas que actúan como señales que van de la célula infectada a las circundantes de forma que la muerte celular se podría activar también en las células vecinas (Bent, 1996; Dangl *et al.*, 1996; Greenberg, 1997).

Las CPs de PaMMV, de PMMoV-S y de PMMoV-I son capaces, por sí mismas de inducir la muerte celular asociada a la HR en plantas de *C. frutescens* (L²L²), *C. chinense* (L³L³) y *C. chacoense* (L⁴L³) respectivamente.

Para verificar si la HR inducida por la interacción de las CPs de PaMMV, PMMoV-S y PMMoV-I, en plantas con los genes L², L³ y L⁴ respectivamente, está asociada con la inducción de genes de defensa de la planta se cotransfectaron los plásmidos pMJD-CPPa, pMJD-CPS y pMJD-CPI, con el gen GUS bajo el control del promotor *gn1* de *N.plumbaginifolia* (Castresana *et al.*, 1990). La expresión de la β -glucuronidasa bajo este promotor se ha visto que se encuentra fuertemente inducida en plantas transgénicas de *N.tabacum* durante la HR inducida por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Castresana *et al.*, 1990; Obregon, 1997).

La expresión de este gen junto a la de las CPs de las cepas avirulentas en las plantas con los correspondientes genes de resistencia producía la inducción de la actividad GUS que aumentaba con el tiempo hasta las 24 h.p.b. Esto indica que los mecanismos de resistencia de la planta se activan cuando el gen Avr se expresa en las células de los hospedadores con el correspondiente gen de resistencia. Está bien establecido que las PR se inducen de forma rápida y exponencial cuando se dan interacciones incompatibles en las plantas. En las plantas de pimiento esta inducción la observamos desde las 8 h.p.b. en plantas de *C.chinense* y a partir de las 16 h.p.b. en plantas de *C.frutescens* y *C.chacoense*, en tiempos tempranos la actividad GUS asociada a la inducción de gn1 es muy débil, mientras que a las 24 horas en que el incremento es notorio. Sin embargo cuando las hojas fueron transfectedas con la CP de la cepa virulenta para un determinado genotipo de *Capsicum* o con el vector vacío, no se observó actividad GUS en ninguno de los tiempos analizados.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos al transformar plantas de *N.tabacum* con la construcción del gen de la β -glucuronidasa bajo el promotor gn1. Este gen se induce en la interacción incompatible con la bacteria necrotizante *P.syringae* pv. *syringae* (Castresana *et al.*, 1990; Obregon, 1997). A partir de las 12 h.p.i. se revela actividad GUS en las áreas infectadas y esta actividad aumentaba a las 24 h.p.i.. En plantas de *N.tabacum* cv Sansum NN transformadas con la construcción formada por el promotor de la PR1a controlando la expresión del gen GUS se observa actividad GUS en las lesiones producidas por TMV (Ohshima *et al.*, 1990).

Cuando se expresa transitoriamente el inductor viral de la resistencia conferida por los genes L en *Capsicum*, hay una fuerte expresión inducción transcripcional de los marcadores asociados a la respuesta de defensa, como son las PRs.

El efecto de la resistencia conferida por el gen L³ en plantas de *C.chinense* sobre el ciclo de infección de PMMoV-S fue analizado mediante el estudio comparativo de la cinética acumulación del ARN viral y la CP viral a lo largo del tiempo de infección de las cepas S e I de PMMoV. Observamos que tanto las cadenas + como las - del ARN de PMMoV-S se detectan a partir de 2 d.p.i., incrementándose hasta los 3 d.p.i. Posteriormente la cantidad de ARN acumulado se mantiene constante hasta los 7 d.p.i. sin que existan diferencias de acumulación entre

las cadenas del ARN genómico y el subgenómico de la CP. Por el contrario cuando se analiza la acumulación del ARN de la cepa italiana se observa que tanto las cadenas + como las – se detectan desde el día 1 post inoculación y que hay una acumulación exponencial del ARN a lo largo del tiempo, como cabría esperar en una cepa que es capaz de sobrepasar la resistencia.

En trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio en protoplastos de plantas de *C.chinense* (Gilardi *et al.*, en prensa) se determinó que a las 24 horas post transfección del ARN viral de PMMoV-S y de PMMoV-I la acumulación era similar de forma que la replicación del virus no se ve afectada por la resistencia, lo que indica que la resistencia no es efectiva en células individuales. Partiendo del hecho de que la replicación del virus no está afectada en células individuales, el que los niveles de acumulación se mantengan constantes a partir de 3 d.p.i. nos indica que la resistencia afecta al movimiento del virus de célula a célula.

El que haya una cierta acumulación viral entre los días 1 y 3 post inoculación indicaría que en fases tempranas de la resistencia el virus podría moverse a las células adyacentes y esto generaría una cierta inducción de la acumulación de las cadenas negativas entre los días 1 y 3. Una vez establecida esta infección la planta estaría limitando la cantidad de ARN que el virus es capaz de acumular. Esto podría ser bien porque hay un ciclo de degradación/formación de nuevas moléculas de ARN, o bien, si no existe una degradación de las mismas, cuando se han acumulado hasta un determinado nivel las células limitan la formación de nuevas moléculas de ARN. Posteriormente a estos días ya no existiría infección de nuevas células.

La detección de la acumulación de las cadenas de ARN de PMMoV-S se detiene a los 3 d.p.i. y a partir de los 4-5 d.p.i. las LLN ya son visibles en las HI, esto nos está indicando que antes de aparecer las LLN la movilidad del virus ya está afectada. El que se pueda seguir detectando el ARN hasta los 7 d.p.i. nos podría indicar que el ARN viral es altamente estable y que el virus, como sucede con TMV en plantas de tabaco, no se encuentra sólo en las células afectadas por la necrosis, sino que es capaz de permanecer en las células que se mantienen alrededor de las lesiones locales. En el caso de TMV se han podido aislar partículas virales viables alrededor de las LLN (Mathews, 1991).

En plantas de tabaco con el gen N en los primeros días de infección TMV es capaz de replicarse y acumularse hasta unos determinados niveles antes de que se produzca el colapso de las células como resultado de la reacción necrótica (Otsuki *et al.*, 1972; Kubo, 1971).

Recientemente se ha observado que el ácido salicílico es capaz de inhibir la replicación de ciertos virus, incluso en plantas que no son capaces de establecer reacciones de resistencia, (Chivasa *et al.*, 1997; Naylor *et al.*, 1998), y de impedir el movimiento célula a célula (Naylor *et al.*, 1998). En plantas de *N. benthamiana* la aplicación de SA es capaz de inhibir la replicación de TMV y PVX disminuyendo tanto la acumulación del ARN genómico como la proporción en la acumulación ARN genómico/ARN subgenómico de la CP. En el caso de CMV no es capaz de inhibir la replicación del virus, pero sí su movimiento a corta y larga distancia (Naylor *et al.*, 1998).

En el caso de las plantas que fueron inoculadas con PMMoV-I este virus es capaz de sobrepasar la resistencia y de infectar las plantas completas. Así pues el virus es capaz de moverse célula a célula, y en las sucesivas células en las que se establece va formando nuevas moléculas de ARN que hace que la acumulación del mismo sea exponencial en el tiempo.

Cuando se analiza la cinética de acumulación de la proteína de cubierta de PMMoV producida vemos que en las plantas inoculadas con la cepa española de PMMoV hay un cierto incremento en su concentración a lo largo del tiempo. La proteína se produce y acumula hasta los 5-6 d.p.i., mientras que como hemos indicado antes los niveles de ARN subgenómico de la CP no aumentan a partir de los 3 d.p.i. Esto significaría que el paso de la traducción de proteínas no está afectado en este periodo de tiempo por la aparición de la resistencia. La aparición de lesiones locales necróticas se produjo a los 5 d.p.i. por lo que el descenso que existe en la concentración de la CP a partir de 6 d.p.i. se puede deber al colapso de las células del huésped.

En las plantas inoculadas con PMMoV-I la concentración de la CP viral es de un rango de hasta 10^3 veces mayor. Se observa al igual que cuando se analiza la acumulación de los ARN el aumento de la concentración de la CP es exponencial en

el tiempo y presenta unos niveles muy superiores a los de la CP de PMMoV-S desde los primeros tiempos de la infección.

Se encuentra ampliamente descrito en la bibliografía que asociados a la HR hay una serie de cambios fisiológicos que llevan al fenómeno denominado muerte celular. Entre estos cambios se encuentran la producción local de especies activas de oxígenos (aniones superóxido y agua oxigenada), deposición de callosa, aparición de necrosis y la inducción de genes de proteínas relacionadas con la patogénesis. Para caracterizar la resistencia de *C.chinense* a PMMoV-S decidimos estudiar estos aspectos.

El llamado estallido oxidativo es una respuesta características de las células vegetales a la inoculación con patógenos avirulentos (Sutherland, 1991; Baker *et al.*, 1993; Mehdy, 1994). La definición original del estallido oxidativo en mamíferos fue el rápido incremento en el consumo de oxígeno por fagocitos que eran resistentes a inhibidores de la respiración como la azida y la cianida. Se ha demostrado que en plantas existen también sistemas que llevan al estallido oxidativo pero sin embargo en estos organismos se ha medido como la producción de especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, en vez del consumo de oxígeno (Murphy *et al.*, 1998).

En los experimentos llevados a cabo hemos demostrado que existe una inducción de este estallido oxidativo, medido como incremento en la acumulación de O_2^- y H_2O_2 en los tejidos, asociada a la interacción incompatible PMMoV-S-*C.chinense* y no a la compatible PMMoV-I-*C.chinense*.

La presencia de aniones superóxido se midió como actividad reductora de NBT. En los años 80 Doke observó la generación de O_2^- durante la interacción entre plantas de patata y *Phytophora infestans*, y su posible implicación en la HR. Entre otros compuestos utilizó el NBT para su detección. El radical superóxido reduce el NBT en varios pasos de reducción de un electrón a formazan y a diformazan (Auclair y Vaoisin, 1985). Durante los experimentos llevados a cabo en plantas de *C. chinense* inoculadas con PMMoV-S e I, observamos que se inducen los O_2^- aunque la inducción mayor se observa en plantas en las que se desarrolla la reacción incompatible, observándose el máximo de acumulación a las 9 h.p.i..

En 1996 Jabs *et al.* determinaron la producción de aniones superóxido en los mutantes *Isd1* de *Arabidopsis thaliana*. Estos autores establecieron en sus experimentos una relación entre la producción de aniones superóxido y la iniciación de mecanismos que llevan a la muerte celular programada. Estos mutantes inician la muerte celular en ausencia de patógenos bajo determinadas condiciones ambientales y no son capaces de controlar la expansión de la lesión una vez comenzada. En estos mutantes cuando se induce la formación de lesiones hay una acumulación importante de aniones superóxido a partir de las 8 horas de la inducción. Así mismo observaron que a las 16 horas a partir de la inducción de la producción de O_2^- comenzaba la muerte celular que se desarrollaba hasta las 48 horas. En *C. chinense* la detección de la muerte celular se produce a las 14 h.p.i.. El intervalo de tiempos entre la acumulación de O_2^- y el comienzo de la muerte celular es similar al observado en los mutantes de *Arabidopsis*.

Los tejidos infectados con PMMoV-S responden también con la producción de agua oxigenada. Aunque en plantas inoculadas con PMMoV-I se observa una producción de H_2O_2 , el “estallido” se produce mayoritariamente en plantas infectadas con la cepa inductora de la resistencia y presenta un máximo de producción de H_2O_2 a las 10 h.p.i. El que aparezca una ligera producción de agua oxigenada cuando se infecta con una cepa virulenta de un patógeno ya se ha observado con anterioridad. Cepas virulentas de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* son capaces de inducir una ligera producción de agua oxigenada cuando infecta células de soja (Levine *et al.*, 1994).

Podemos apreciar que la producción de agua oxigenada sigue una curva bifásica. Se puede establecer una primera fase hasta las 6 h.p.i. y una segunda en la que se produciría ya el “estallido” oxidativo que iniciaría a las 8 h.p.i. y se alargaría hasta las 36 h.p.i. En la primera fase hay también una inducción en la producción de agua oxigenada en las plantas inoculadas con la cepa compatible. Esta producción se mantiene constante y en los mismos niveles a lo largo del tiempo en las plantas inoculadas con la cepa italiana, lo que indicaría que se encuentra asociada al establecimiento y desarrollo de la infección por un microorganismo que no es inductor de la resistencia.

Estudios llevados a cabo por Baker y Orlandi (1995) caracterizaron la respuesta de plantas de tabaco a *Pseudomonas syringae*. Observaron que la respuesta de producción de H_2O_2 en las reacciones incompatibles presenta dos fases (Baker *et al.*, 1991; Keppler *et al.*, 1989). La fase I es relativamente corta y es una respuesta no específica que ocurre inmediatamente después de la inoculación tanto de los patovares compatibles como de los incompatibles. La fase II es una respuesta más larga y aparece como específica de las relaciones incompatibles. Se han estudiado varios sistemas como los de soja (Baker *et al.*, 1993), tabaco (Baker *et al.*, 1991), patata (Baker y Orlandi, 1995) y alfalfa (Baker y Orlandi, 1995) tratados con varias especies de *Pseudomonas* y en tabaco tratado con *Erwinia amylovora* (Baker *et al.*, 1993) en los que esta característica también se cumple.

Cuando analizamos los datos obtenidos en plantas de pimiento infectadas con PMMoV-S vemos que una vez que se produce el estallido oxidativo y la concentración de agua oxigenada llega a un máximo entre las 10 y las 12 h.p.i., unas horas después comienza la inducción de la muerte celular. Esto no implicaría que estas ROIs fuesen las inductoras de los mecanismos de PCD pero su presencia en altas concentraciones es necesaria para que continúen los mecanismos que llevan al "suicidio celular". Levine *et al.* (1994) determinaron después de la aplicación a tejidos vegetales de pulsos de agua oxigenada se produce la inducción de la muerte celular a partir de una determinada concentración de H_2O_2 . El tiempo de latencia entre ambos procesos variaba dependiendo de la cantidad de agua oxigenada aplicada y se encontraba entre las 2 y las 4 horas. Cuando la concentración de H_2O_2 se mantenía por debajo de unos determinados niveles se inducen los mecanismos de detoxificación de las células y no hay muerte celular. Esto explicaría el porqué a pesar de que se produce H_2O_2 en la interacción compatible *C.chinense*-PMMoV-I en todos los tiempos analizados no hay una inducción significativa de la muerte celular.

El método espectrofotométrico para la cuantificación del Evans Blue retenido en tejidos de plantas se ha demostrado que es muy efectivo en fenómenos que implican patógenos que causan muerte celular (Atkinson *et al.*, 1990; Barker *et al.*, 1993). La muerte celular en plantas de *C.chinense* inoculadas con la cepa española medida como incremento en la captación de Evans Blue por las células muertas comienza a las 8 h.p.i. y continúa hasta las 48 h.p.i., mientras que en las inoculadas con la cepa italiana no se aprecia muerte celular en los tiempos analizados. En otros

sistemas de interacciones incompatibles como soja-*Pseudomonas syringae* han encontrado tiempos similares de inicio de muerte celular después de la inoculación del patógeno (Levine *et al.* 1994) independientemente de la cantidad de inóculo utilizado.

Dos de los marcadores histológicos de la resistencia como son la aparición de compuestos fenólicos y la deposición de callosa han sido determinados en los estudios llevados a cabo. En las muestras de plantas de *C. chinense* tratadas con virus inductores y no inductores de la resistencia sólo se ha visto que se produzca la aparición de estos compuestos en las plantas inoculadas con la cepa española de PMMoV. La acumulación de compuestos fluorescentes alrededor de las zonas en la que aparecen las lesiones locales necróticas es ampliamente conocido y se debe a la actividad de las enzimas de la ruta del fenilpropanoico. En plantas de tabaco inoculadas con inductores fúngicos se ha determinado esta acumulación cuando aparecen las LLN (Baillieul *et al.*, 1995).

En infecciones causadas por virus los cambios en la producción de compuestos fenólicos son característicos de huéspedes que desarrollan la HR. En pimiento la formación y acumulación de estos compuestos fluorescentes se produce a partir de 24 h.p.i. en plantas infectadas con PMMoV-S, 48 horas antes de que se produzca la formación de la LLN,. Las zonas en las que se acumulan estos compuestos van creciendo en diámetro conforme se va estableciendo la reacción de defensa. En plantas infectadas con PMMoV-I se pueden apreciar algunas zonas discretas de acumulación.

En la interacción entre TMV y plantas de *Nicotiana tabacum* var "Samsun NN" se ha visto que después de la infección con TMV hay un incremento en la concentración de dos compuestos fenólicos como son la escopoletina y el ácido clorogénico a partir de las 30 h.p.i. (Fritig *et al.*, 1972). Este fenómeno lo asociaron primero a un efecto de la infección del virus que inducía la resistencia y posteriormente a la aparición de lesiones locales necróticas en los lugares en los que detectaban la aparición de los compuestos. Es decir que se inducían antes de que la lesión necrótica estuviese bien establecida.

La rápida deposición de callosa se ha asociado a los fenómenos de incompatibilidad patógeno-plantas (Kauss, 1990) y en el caso de los virus se piensa

que el bloqueo de los plasmodesmos es esencial para impedir el movimiento célula a célula de los mismos (Beffa *et al.*, 1996). La deposición de callosa sólo se observó en células de hojas infectadas con la cepa española de PMMoV, y no en las infectadas con PMMoV-I. Dentro del tejido analizado se observó que a partir de las 48 h.p.i. hay una deposición importante en los vasos conductores de las HI. Esto podría ser un efecto para impedir el movimiento del virus no sólo a corta distancia con la deposición de callosa en plasmodesmos sino también a larga distancia a través de vasos conductores. En mutantes de arroz resistentes al hongo *Magnaporthe grisea* detectaron deposiciones de callosa sólo en aquellas células que se encontraban muertas o en procesos de muerte celular (Takahashi *et al.*, 1999).

El que aumente el tamaño de las zonas en las que se detectaron estos compuestos con el tiempo indica que el fenómeno de resistencia se está desarrollando en las células adyacentes a las inicialmente infectadas. A partir de las primeras células infectadas podría existir una amplificación del proceso de muerte a las células adyacentes mediada por moléculas como el H_2O_2 para frenar de una forma más efectiva la dispersión del virus. Tampoco hay que descartar el que en los estadios iniciales de la infección el virus sea capaz de moverse célula a célula e infectar a las más cercanas con lo que la cantidad de células que desarrollan la resistencia se iría incrementando hasta que los mecanismos de resistencia restringieran a los virus en las células que están infectando. La aparición de zonas de deposición de callosa y de compuestos fenólicos serían cada vez mayores y eso es lo que hemos podido observar en las muestras analizadas.

caso es de ARN y la detección de la proteína podría estar un poco desplazada en el tiempo.

Los mecanismos de defensa inducibles en plantas se ponen de manifiesto justo después del reconocimiento del patógeno, por lo que los productos de defensa están normalmente ausentes o en muy pequeñas cantidades en tejidos sanos y sólo se pueden detectar durante la expresión de la resistencia.

Un paso para investigar los mecanismos implicados en las interacciones incompatibles entre plantas de pimiento y PMMoV ha sido el aislamiento de moléculas de cADN expresados de forma diferencial entre plantas infectadas con una cepa que desencadena la resistencia y una cepa que la sobrepasa. En este estudio hemos

analizado las secuencias de los cADN obtenidos, de forma que se ha investigado la posible implicación en mecanismos de resistencia de las secuencias con las que los cADN han mostrado homología. El tiempo de 8 h.p.i. fue elegido porque es el momento en el que se disparan los mecanismos de muerte celular y cuando dos parámetros que marcan el establecimiento de la HR como son la formación de aniones superóxido y de agua oxigenada se encuentran en su fase de inducción.

Entre las secuencias aisladas por este método con las que existía homología había algunas que se encuentran implicadas en mecanismos de defensa como son la ACC oxidasa, que es una enzima clave en la síntesis de etileno, la S-adenosil metionina decarboxilasa, enzima reguladora de la síntesis de espermina y espermidina, y del equilibrio de la formación de estas moléculas y del etileno, la ω -3 desaturasa de ácidos grasos, implicada en el metabolismo de ácidos grasos,

El etileno regula un amplio rango de procesos fisiológicos y de desarrollo en las plantas. Las dos enzimas claves en la regulación de la síntesis del etileno son la ACC sintasa y la ACC oxidasa. En un principio se creyó que la ACC oxidasa era una enzima que se expresaba de forma constitutiva (Yang y Hoffman, 1984). Sin embargo algunos estudios sugieren que estos genes son inducibles por herida (Callahan *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1997) y tratamientos con inductores de la respuesta de defensa como el ácido araquidónico (García-Pineda y Lozoya-Gloria, 1999).

La síntesis de poliaminas en plantas es compleja y no se comprende totalmente. La S-adenosilmetionina-decarboxilasa (SAMDC) es la enzima clave en la síntesis de las poliaminas espermidina y espermina y su actividad es la que marca el ritmo de producción de estos compuestos (Slocum *et al.*, 1984; Tabor y Tabor, 1984). Las poliaminas y el etileno están biosintéticamente relacionadas puesto que comparten un precursor común la S-adenosilmetionina (Kushad y Dumbroff, 1991) y se conoce que la actividad de la SAMDC influye en la biosíntesis del etileno (Apelbaum *et al.*, 1985; Galston y Kaur-Sawhney, 1987). Recientemente se ha demostrado que la espermidina se induce en plantas de tabaco que han sido infectadas con TMV en las hojas que están desarrollando necrosis. Se ha propuesto que en estas hojas la espermidina actúa como un inductor endógeno de la síntesis de proteínas PRs ácidas y

básicas (Hiraga et al., 2000), y de la resistencia a TMV en estas plantas (Yamakawa et al., 1998).

En plantas las ω -3 desaturasa de ácidos grasos (ω -3 FAD) son enzimas unidas a membranas que catalizan la conversión de ácido linoleico a ácido linolénico, que entre los ácidos grasos es el mayor constituyente de lípidos de membrana en plantas superiores. Se ha demostrado que en plantas y en suspensiones de cultivos celulares de *Petroselinum crispum* tratadas con un elicitador fúngico causa un rápido incremento en los niveles de varios ácidos insaturados (Kirch et al., 1997). Los resultados obtenidos por este grupo demuestran que la exposición de los cultivos celulares al inductor producen cambios en el metabolismo de ácidos grasos insaturados. En estos experimentos se ha observado el ácido linoleico desciende y el linolénico aumenta en unas pocas horas. Más específicamente, muestran que uno de los genes que se inducen de forma pronunciada es el de la ω -3 FAD, y la expresión de este gen ocurre de forma rápida y está altamente localizada alrededor de los sitios de penetración del hongo. La inducción del mRNA de esta proteína se observa desde las 2 h.p.i. en hojas.

La resistencia local adquirida (LAR) y la sistémica adquirida (SAR) puede ser diferenciada de otras respuestas de resistencia por el amplio espectro de protección frente a patógenos y los cambios asociados en la expresión de genes. La inoculación de plantas de *C. chinense* (L^3L^3) con PMMoV-S, virus inductor de la resistencia, induce la LAR en hojas inoculadas y protege frente a una segunda infección por un virus no relacionado como es PVX. Sin embargo para que esta protección sea efectiva es necesario un tiempo de inducción que es de al menos 24 horas después de la inoculación inductora.

El que no exista una reducción de la cantidad de virus PVX detectable en HS cuando se inocula el virus desafiante a la vez bien con tampon o bien con la cepa inductora refleja el que no existe ningún tipo de interferencia en la replicación de ambos tipos de virus en las hojas inoculadas puesto que no hay retraso en el tiempo de infección de hojas superiores con respecto a las plantas control ni tampoco descenso apreciable de la concentración de la CP del virus desafiante como hemos indicado anteriormente el establecimiento de LAR requiere al menos 24 h de inducción y a que sólo algunas plantas eran

infectadas por el virus PVX capaz de infectarlas y en estas sí que se observaba una reducción en la concentración del virus en las HS. La inducción de LAR en este huésped es completa a 48 h.p.i. del virus inductor. Esto hace pensar que los mecanismos que delimitan el virus en las zonas inoculadas están activados pero que PVX es capaz de sobrepasarlos, bien porque tiene altos niveles de replicación, bien porque los mecanismos de delimitación no están completamente activados. Sin embargo, en este huésped no se establece SAR, al menos en los tiempos analizados.

En tabaco, la activación de la SAR es efectiva en la reducción de síntomas en las enfermedades producidas por algunos hongos como *Phytophthora parasitica*, *Cercospora nicotianae* y *Peronospora tabacina*, algunos virus como TMV y el virus de la necrosis del tabaco (TNV), y algunas bacterias como *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* y *Erwinia carotovora* (Vernooij *et al.*, 1995). Sin embargo esta protección no es efectiva frente a todos los patógenos como *Botrytis cinerea* y *AlteARNria alteARNta*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han clonado las proteínas de cubierta de los virus PaMMV, PMMoV y PMMoV-I en el vector de expresión en plantas derivado de PVX. Su expresión en plantas de *N. sylvestris* induciendo una respuesta en forma de lesiones locales necróticas similar a la de los tobamovirus.
2. La aparición de lesiones locales necróticas en plantas de *C. frutescens* inoculadas con el virus quimera PVX-CPPa, en plantas de *C. chinense* inoculada con los virus quimera PVX-CPPa y PVX-CPS, y en plantas de *C. chacoense* inoculadas con PVX-CPPa, PVX-CPS y PVX-CPI, fue similar en el tiempo a las aparecidas en estos huéspedes inoculados con los tobamovirus. En *C. frutescens* y *C. chinense* las lesiones producidas por los virus quimera y los tobamovirus fueron similares en cuanto a forma y tamaño. En las plantas de *C. chacoense* las lesiones producidas por los virus quimera aparecían más delimitadas que las producidas por el tobamovirus.
3. La movilidad de los virus quimera capaces de inducir resistencia en las plantas del género *Capsicum* se limitaba a las HI, puesto que no se ha detectado ni la CP ni su secuencia en hojas superiores no inoculadas.
4. En todos los casos de las interacciones *C. frutescens* – PVX-Cpa, *C. chinense* – PVX-CPS y *C. chacoense* – PVX-CPI, se ha demostrado que se induce la formación de la proteína relacionada con la patogénesis PR1, al igual que cuando se inoculan los tobamovirus correspondientes. En plantas de *C. frutescens* y *C. chacoense* esta proteína también se acumulaba cuando las plantas eran inoculadas con el virus vector vacío, aunque a tiempos más tardíos.
5. La clonación de las CPs de PaMMV, PMMoV-s y PMMoV-I en el vector de expresión pMJD82 nos permitió determinar que la CP de los tobamovirus por sí misma, y fuera de otro contexto viral, es capaz de inducir la HR en plantas del género *Capsicum* con la serie alélica L. La expresión de las CPs es capaz de inducir tanto la muerte celular como genes asociados a la respuesta de defensa.
6. El estudio de la resistencia mediada por el gen L^3 en plantas de *C. chinense* frente a PMMoV-S ha permitido diferenciar que el proceso viral que se encuentra afectado es la acumulación del ARN, y no la traducción.
7. Entre los factores asociados a la respuesta de defensa se ha determinado que durante la interacción incompatible *C. chinense* – PMMoV-S se induce la formación de aniones superóxido y agua oxigenada. La acumulación de agua oxigenada sigue una cinética denominada de dos fases característica de las reacciones incompatibles huésped-patógeno.

8. En plantas de *C. chinense* inoculadas con PMMoV-S se ha determinado la acumulación de callosa en las células vegetales y venas de las hojas inoculadas. Se ha determinado así mismo la acumulación de compuestos fenólicos fluorescentes antes de que se muestre visible la lesión necrótica.
9. Se ha analizado la inducción de genes asociados a la reacción de defensa vegetal en plantas de *C. chinense* inoculadas con PMMoV-S. Algunos de los genes inducidos mostraron homología con genes que se han asociado a la respuesta de defensa en otros huéspedes como con la ACC oxidasa, la ω -3 desaturasa de ácidos grasos, la S adenosilmetionina decarboxilasa, la NadH plastoquinona oxidoreductasa y la citocromo oxidasa mitocondrial.
10. El fenómeno de resistencia adquirida en plantas de *C. chinense* inoculadas con PMMoV-S aparece sólo en las hojas inoculadas con PMMoV-S frente a inoculaciones posteriores con un virus perteneciente a otro grupo como PVX. El periodo de inducción de esta resistencia se encuentra entre las 24 y 48 h.p.i. del virus protector. No se ha observado inducción de resistencia en hojas no inoculadas.

BIBLIOGRAFIA

Abad, L.R., Dürzo, M.P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Reuveni, M., Zhu, J.K., Niu, X., Singh, N.K., Hasegawa, P.M., y Bressan, R.A. (1996). **Plant Sci.** 118:11-23.

Abbink, T.E.M., Tjernberg, P.A., Bol, J.F., y Linthorst, H.J.M. (1998). Tobacco Mosaic Virus helicase domain induces necrosis in N gene-carrying tobacco in the absence of virus replication. **Mol. Plant Microb. Interac.** 11:1242-1246.

Alfano, J.R., y Collmer, A. (1996) Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. **Plant Cell** 8:1683-1698.

Alonso, E., García-Luque, I., de la Cruz, A., Wicke, B., Avila-Rincón, M.J., Serra, M.T., Castresana, C. y Díaz-Ruiz, J.R. (1991). Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. **J. Gen. Virol.** 72:2875-2884.

Alonso, E., García-Luque, I., Avila-Rincón, M.J. Wicke, B., Serra, M.T., y Díaz-Ruiz, J.R. (1989). A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. **J. Phytopathol.** 125: 67-76.

Ahlquist, P., y Pacha, R.F. (1990) Gene amplification y expression by RNA viruses y potential for further application to plant gene transfer. **Physiol. Plant** 79:163-167.

Antoniw, J.F., y White, R.F. (1980). The effects of aspirin and polyacrylic acid on soluble leaf proteins and resistance to virus infection in five cultivars of tobacco. **Phytopathology**, 98:331-341.

Apelbaum, A., Goldust, A., y Icekson, I. (1985). Control by ethylene of arginine decarboxylase activity in pea seedlings y its implication for hormonal regulation of plant growth. **Plant Physiol.**, 79:635.

Arteaga, M.L. y Ortega, R.G. (1981). Primeras observaciones de "cepas de pimiento del virus del mosaico del tabaco" (TMV) en pimiento. **ITEA** 42:27-32.

Atkinson, M.M.; Huang, J.S., y Knopp, J.A. (1985) **Phytopathology** 77:843-847.

Atkinson, M.M.; Keppler, L.D.; Orlyi, E.W.; Baker, C.J.; y Mischke, C.F. (1990). Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K⁺⁺ y hypersensitive responses in tobacco. **Plant Physiol.** 77:1268-1272.

- Atkinson, M.M., Huang, J.S., y Knopp, J.A. (1985) The hypersensitive reaction of tobacco to *Pseudomonas syringae* pv. Pisi: activation of plasmalemma K⁺/H⁺ exchange mechanism. **Plant Physiol.** 79:843-47.
- Auckair, C., y Voisin, E. (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald R.A. (ed.), CRC Hybook of Methods of Oxygen Radical Research, pp 123-132. CRC, Boca Raton, FL.
- Avgelis, A.D. (1986). A pepper strain of TMV who is new in Crete (Greece). **Phytopathol. Medit.** 25:33-38.
- Avrameas, S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens y antibodies. **Immunochemistry** 6:43-53.
- Baillieul, F., Genetet, I., Kopp, M., Saindrenen, P., Fritig, B., y Kauffmann (1995). A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, y induction os systemic resistance. **The Plant Journal** 8:551-560.
- Baker, C.J., y Orlyi, E.W. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathology.** 33:299-322.
- Baker, C.J., Mock, N., Glazener, J., y Orlyi, E.W. (1993). Recognition responses in pathogen/non-host y race/cultivar interactions involving soybean (*Glycine max*) y *Pseudomonas syringae* pathovars. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 43:81-94.
- Baker, C.J., O'Neil, N.R., Keppler, L.D., y Orlyi, E.W. (1991). Early responses during plant-bacteria interactions in tobacco cell suspensions. **Phytopathology.** 81: 1504-7.
- Baker, C.J., y Orlyi, E.W. (1991). Early responses during plant-bacterial interactions in tobacco cell suspensions. **Phytopathology.** 81:1504-7.
- Baker, C.J.; Atkinson, M.M., y Collmer, A. (1987). Concurrent loss in Tn5 mutants of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* of the ability to induce the hypersensitive response and host plasma membrane K⁺/H⁺ exchange in tobacco. **Phytopathology** 77:1268-1272.
- Beffa, R.S., Hofer, R.M., Thomas, M., y Meins, F. (1996). Decreased susceptibility to viral disease of β -1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. **Plant Cell** 8:1001-1011.

- Bendahmane, A., Köhm, B.A. Dedi, C., y Baulcombe, C. (1995). The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. **Plant J.** 8:933-941
- Bent, A.F. (1996). Plant disease resistance genes- Function meets structure. **Plant Cell** 8: 1757-17771.
- Berzal-Herranz, A., De La Cruz, A., Tenllado, F., Díaz-Ruiz, J.R., López, L., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M.T., y García-Luque, I. (1995). The *Capsicum* L³ gene-mediated resistance against tobamovirus is elicited by the coat protein. **Virology** 209:498-505.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennet, M.H.R., y Mansfield, J.W. (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Plant Cell** 9:209-221.
- Billeter, M.A., Weissman, C., y Warner, R.C. (1966). Replication of double stranded RNA from *Escherichia coli* infected with bacteriophage MS2. **J. Mol. Biol.** 17:145-173.
- Bol, J.F., Linthorst, B.J., y Cornelissen, B.J.C. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Ann. Rev. Phytopathol.** 28:113-138.
- Boukema, I.W. (1984). Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. Is governed by an allele of the L-locus. **Capsicum Newsletter**, 3:47-48.
- Boukema, I.W. (1982). Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by an allele of the L-locus. **Capsicum Newslet.** 3:47-48.
- Boukema, I.W., Janse, K., y Hofman, K. (1980). Strains of TMV y genes for resistance in *Capsicum*. Eucarpia *Capsicum* Working Group, **Synopses of the IVth Meeting**, Wageningen (Países Bajos) 44-48.
- Boller, T. (1991). Ethylene in pathogenesis y disease resistance. In: **The plant hormone ethylene**. Edited by Mattoo, A.K., y Suttle, J.C. pp. 293-314. CRC press, Boca Raton, F.L.
- Boukema, I.W. (1980). Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum* L. **Euphytica**. 29:433-439.
- Boukema, I.W., Jansen, K., y Hofman, K. (1980). Proc 4th *Capsicum* Eucarpia meeting. Wageningen, 44.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid y sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254.
- Brederode, F.T., Linthorst, H.J.M., y Bol, J.F. (1991). Differential induction of acquired resistance y PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light y wounding. **Plant Mol. Biol.** 17:117-1125.
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., Desamblanx, G.W., y Osborn, R.W. (1997). Antimicrobial peptides from plants. **Crit. Rev. Plant Sci.** 16:297-323.
- Callahan, A.M., Morgens, P.H., Wright, P., Nichols, K.E. (1992). Comparison of Pch313 (pTOM13 homolog) RNA accumulation during fruit softening y wounding of two phenotypically different peach cultivars. **Plant Physiol.** 100:482-488.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., y Dong, X. (1994). Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **Plant Cell** 6:1583-1592.
- Castresana, C., de Carvalho, F., Gheysen, G., Habets, M., Inzé, D., y Van Montagu, M. (1990). Tissue-specific y pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* β -1,3-glucanase gene. **Plant Cell.** 2:1131-1143.
- Chapman, S., Kavanagh, T., y Baulcome, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. **Plant J.** 2:549-557.
- Cheo, P.C. (1970). Subliminal infection of cotton by tobacco mosaic virus. **Phytopathology**, 60:41-46.
- Chivasa, S., Murphy, A.M., Naylor, M., y Carr, J.P. (1997). Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicyllhydroxamic acid-sensitive mechanism. **Plant Cell** 9:547-557.
- Citovsky, V., Wong, M.L., Shaw, A.L., Ventakataran Prasad, B.V. y Zambryski, P. (1992). Visualization y characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. **Plant Cell** 4:397-411.
- Clark, M.F. y Adams, A.N. (1977). Characteristics of a microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol.** 34:475-483.

Crute, I.R., y Pink, D.A.C. (1996) Genetics y utilization of pathogen resistance in plants. **Plant Cell** 8:1747-1755.

Culver, J.N. (1996). Tobamovirus cross protection using a potexvirus vector. **Virology**, 226:228

Culver, J.N. y Dawson, W.O. (1991). Tobacco mosaic virus elicitor coat protein genes produce a hypersensitive phenotype in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 4:458-463.

Dangl, J.L., Dietrich, R.A., R.A., y Richberg, M.H. (1996). Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. **Plant Cell** 8:1793-1807.

Dardick, C.D., Taraporewala, Z.F., Lu, B., and Culver, J.N. (1999). Comparison of tobamovirus coat protein structural features that affect elicitor activity in pepper, eggplant, and tobacco. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 12:247-251.

Dardick, C.D, and Culver, J.N (1997). Tobamovirus Coat Proteins: elicitors of the hypersensitive response in *Solanum melongena* (eggplant) **Mol. Plant Microb. Interact.** 6:776-778.

De la Cruz, A., López, L., Tenllado, F. Díaz-Ruiz, J.R., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M.T., and García-Luque, I. (1997). The coat protein is required for the elicitation of the *Capsicum* L² gene-mediated resistance against the tobamoviruses. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 10:107-113.

De Laat, A.M.M., Branderburg, D.C.C., y Van Loon, L.C. (1981). Regulation of ethylene biosynthesis in virus-infected tobacco leaves. I. Determination of the role of methionine as the precursor of ethylene. **Plant Physiol.**, 68:256-260.

Dempsey, D.A., Pathirana, M.S., Wobbe, K.K., y Klessig, D.F. (1997). Identification of an *Arabidopsis* locus required for resistance to turnip crinkle virus. **Plant J.** 11:301-311.

Dietrich, R.A., Delaney, T., T.P., Ukness, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., y Dang, J.L. (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. **Cell** 77:565-577.

Dinesh-Kumar, S.P., Whitham, S., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., y Baker, B. (1995). Transposon tagging of tobacco mosaic virus resistance gene N: its possible role in the TMV-N-mediated signal transduction pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:4175-4180.

Dixon, R.A., y Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell** 7:1085-1097.

- Doares, S.H., Narváez-Vásquez, J., Conconi, A., y Ryan, C.A. (1995). Salicylic acid inhibits the synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. **Plant Physiol.** 108:1741-1746.
- Dodds, J.A. (1982). Cross-protection and interference between electrophoretically distinct strains of cucumber mosaic virus in tomato. **Virology** 118:235-240.
- Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 1:316-323.
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M.A., Saindrenan, P., Fritig, B., and Kauffman, S. (1997). Spatial and temporal induction of cell death, defense genes and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. **Mol. Plant Microb. Interact.** 10:646-655.
- Dowson Day, M.J., Ashurst, J.L., and Dixon, R.A. (1994). Plant expression cassettes for enhanced translation efficiency. **Plant Mol. Biol. Repr.** 12:347-357.
- Ecker, J.R., y Theologis, A. (1994). Ethylene: a unique plant signal molecule. In: **Arabidopsis**. Edited by Meyerowitz, E.M., y Somerville, C.R. pp 485-521. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Edwards, M.C., y McMullen, M.P. (1988). Variation in tolerance to wheat streak mosaic virus among cultivars of hard red spring wheat. **Plant Dis.** 72:705-707.
- Les Erickson, F., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C., y Baker, B. (1999). The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. **Plant Journal** 18:67-75.
- Erkan, S. and Yorganci, U. (1983). A strain of tobacco mosaic virus affecting pepper plants. **J. Turk. Phytopathol.** 12:83-101.
- Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. **Ann. Rev. Phytopathol.** 9: 275-296.
- Flor, H.H. (1956). The complementary genetic systems in flax and flax rust. **Adv. Genet.** 8:29-54.
- Flor, H.H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology** 32:653-669.

Fraser, R.S.S., Loughlin, S.A.R., y Conno, J.C. (1980). Resistance to tobacco mosaic virus in tomato: effects of the TM-1 gene on symptom formation and multiplication of virus strain 1. **J. Gen. Virol.** 50:221-224.

Fritig, B., Legrand, M., y Hirth, L. (1972). Changes in the metabolism of phenolic compounds during the hypersensitive reaction of tobacco to TMV. **Virology** 47:845-848.

Gabriel, D.W. and Rolfe, B.G. (1990). Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. **Annu. Rev. Phytopathol.** 28:365-391.

Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., y Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science** 261:754-756.

Gallie, D.R., Feder, J.N., Schinike, R. T., y Walbot, V. (1991). Functional analysis of the tobacco mosaic virus tRNA-like structure in cytoplasmic gene regulation. **Nuc. Acid. Res.** 19:5031-5036.

Gallie, D.R. (1996). Translational control of cellular and viral mRNAs. **Plant MOL. Biol.** 32:145-158.

Galston, A.W., y Kaur-Sawhney, R. (1990). Polyamines in plant physiology. **Plant Physiol.** 94:406-410.

García-Luque, I., Ferreo, M.L., Rodríguez, J.M., Alonso, E., de la Cruz, A., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M.T., y Díaz-Ruiz, J.R. (1993). **Arch. Virol.** 131:75.

García-Luque, I., Serra, M.T., Alonso, E., Wicke, B., Ferrero, M.L. and Díaz-Ruiz, J.R. (1990). Characterization of a Spanish strain of pepper mild mottle virus (PMMV-S) and its relation to other tobamoviruses. **J. Phytopathol.** 129:1-8.

García-Pineda, E., y Lozoya-Gloria, E. (1999). Induced gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC oxidase) in pepper (*Capsicum annuum* L.) by arachidonic acid. **Plant Sci.** 145:11-21.

Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B. (1990). Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. **Mol Plant- Microb. Interact.** 3:327-333.

Gil Ortega, R. (1993). Resistencia a virus en pimiento. **Phytoma** 50:53-58.

- Gilardi, P., Wicke, B., Castillo, S., de la Cruz, A., Serra, M.T., y García-Luque, I. (1999). Resistance in *Capsicum* spp. against the tobamoviruses. In: **Recent Research Developments in Virology**. S.G. Pandalai, Gen. Ed., Transworld Research Network. India.
- Gilardi, P., García-Luque, I., y Serra M.T. (1998). Pepper mild mottle virus coat protein alone can elicit the *Capsicum* spp. L³ gene-mediated resistance. **Mol Plant- Microb. Interact.** 11:1253-1257.
- Gilchrist, D.G. (1998). Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. **Annu. Rev. Phytopathol.** 36:393-414.
- Goldbach, R., y Welling, J. (1988). Evolution of plus-strand RNA viruses. **Intervirology** 29:260-267.
- Goodman, R.N., y Novacky, A.J. (1994). The hypersensitive reaction of plants to pathogens. A resistance phenomenon. (St. Paul, MN: APS Press).
- Gopalan, S., Bauer, D.W., Alfano, J.R. Loniello, A.O. He S.Y., y Collmer, A. (1996). Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. **Plant Cell**. 8:1095-1105.
- Goulden, M.G., and Baulcombe, D.C. (1993). Functionally homologous host components recognize potato virus X in *Gomphrena globosa* and potato. **Plant Cell** 5:921-930.
- Greenberg, J.T. (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Annu. Rev. Plant Mol. Biol.** 48:525-545.
- Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., and Ausubel, F.M. (1994). Programmed cell death in plants. A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. **Cell** 77:551-563.
- Greenleaf, W.H., Cook, A.A., y Heyn, A.N.J. (1964). **Phytopathology** 54:1367.
- Guo, A., Salih, G., y Klessig, D.F. (2000). Activation of a diverse set during the tobacco resistance response to TMV is independent of salicylic acid; induction of a subset is also ethylene independent. **The Plant J.** 21:409-418.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logeman, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R., y Schmelzer, E. (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:4150-4157.

- Hammond-Kosack, K.E., y Jones, J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48:576-607.
- Hammond-Kosack, K.E., y Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell** 8:1773-1791.
- Hammond-Kosack, K.E., Staskawicz, B.J., Jones, J.D.G. y Baulcome, D.C. (1995). Functional expression of a fungal avirulence gene from a modified potato virus X genome. **Mol. Plant Microb. Interac.** 8:181-185.
- Heath, M.C. (1998). Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. **Eur. J. Plant Pathol.**, 104:117-124.
- Higuchi, R., Krummel, B., y Saiki, R.K. (1988). A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: Study of protein and DNA interactions. **Nucleic Acids Res.** 16:7351-7367.
- Hilf, M.E., y Dawson, W.O. (1993). The tobamovirus capsid protein functions as a host specific determinant of long-distance movement. **Virology**, 193:106-114.
- Hiraga, S., Ito, H., Yamakawa, H., Ohtsubo, N., Seo, S., Mitsuhashi, I., Matsui, H., Honma, M., y Ohashi, Y. (2000). An HR-Induces tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. **Mol. Plant Microb. Interac.** 13:210-216.
- Hull, R. 1989. The movement of viruses in plants. **Ann. Review of Phytopathology** 27:213-240.
- Hull, R. (1990). The use and misuse of viruses in cloning and expression in plants. In Recognition and Response in Plant-Viruses Interactions, NATO Advanced Science Institutes Series, Volume H41 (Fraser, R.S.S., ed.). Berlin: Springer-Verlag, pp:443-457.
- Inzé, D., y Van Montagu, M. (1995). Oxidative stress in plants. **Curr. Opin. Biotechnol.** 3:153-158.
- Ishikawa, M., Naito, S., y Ohno, T. (1993). Effects of the *tom1* mutation of *Arabidopsis thaliana* on the multiplication of tobacco mosaic virus RAN in protoplasts. **J Gen. Virol.** 67:5328-5338.

- Ishikawa, M., Meshi, T., Ohno, T., y Okada, Y. (1991). Specific cessation of minus-strand RNA accumulation at an early stage of tobacco mosaic virus infection. **J. Virol.** 65:861-868.
- Ishikawa, M., Meshi, T., Motoyoshi, F., Takamatsu, N., y Okada, Y. (1986). *In vitro* mutagenesis of the putative replicase genes of tobacco mosaic virus. **Nucleic Acids Res.** 14:8291-8305.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hallbrock, K., y Scheel, D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:4800-4805.
- Jabs, T., Dietrich, R.A., y Dangl, J.L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. **Science** 273:1853-1856.
- Jacquemond, M., y Tepfer, M. (1995). Satellite RNA mediated resistance to plant viruses: are the ecological risk well assessed?
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. y Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive y versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO J.** 6:3901-3907.
- Jones, A.M., y Dangl, J.L. (1996). Logjam at the Styx: Programmed cell death in plants. **Trends Plant Sci.** 1:114-119.
- Joshi, R.L., Joshi, V., y Ow, D.W. (1990). BSMV genome mediated expression of a foreign gene in dicot and monocot plant cells. **EMBO J.**, 9:2663-2669.
- Jung, J.L., y Hahne, G. (1992). A simple method to increase resolution in whole leaf blotting. **Plant Sci.** 82:125-132.
- Kaper, J.M., y Geelen, J.L.M.C. (1971). Studies on stabilizing forces of simple RNA viruses II. Stability, dissociation, and reassembly of cucumber mosaic virus. **J. Mol. Biol.** 56:277-294.
- Kauss, H. (1990). Role of the plasma membrane in host-pathogen interactions. In *The Plant Plasma Membrane-Structure, Function and Molecular Biology*, C. Larsson y I.M. Møller, eds (Berlin: Springer-Verlag). , pp. 320-350.
- Keen, N.T. (1992). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annu. Rev. Genet.** 24:447-463.
- Keen, N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annu. Rev. Genet.** 24:447-463.

- Keppler, L.D., Baker, C.J., y Atkinson, M.M. (1989). Active oxygen production during a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. **Phytopathology**, 79:974-78.
- Kirsch, C., Takamiya-Wik, M., Reinold, S., Hahlbrock, K., y Somssich, I.E. (1997). Rapid, transient, and highly localized induction of plastidial ω -3 fatty acid desaturase mRNA at fungal infection sites in *Petroselinum crispum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:2079-2084.
- Klein, T.M., Gradziel, T., Fromm, M.E., y Syford, J.C. (1988). Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. **BioTechnology** 6:559-563.
- Klement, Z. 1982. Hypersensitivity. In *Phytopathogenic Prokaryotes*, M.S. Mount y G.H. Lacy, eds. (New York: Academic Press), pp. 149-177.
- Knogge, W. (1996). Fungal infection of plants. **Plant Cell** 8:1711-1722.
- Knorr, D.A., y Dawson, W.O. (1988). A point mutation in the tobacco mosaic virus capsid protein gene induces hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:170-174.
- Koenig, R., y Laseman, D.E. (1989). Potato virus X, potexvirus group. In *AAB Descriptions of Plant Viruses*, No. 354 (Murant, A.F. y Harrison, B.D., eds). Warwick: Association of Applied Biologists, 5 pp.
- Kombrink, E., y Somssich, I.E. (1997). Pathogenesis-related proteins and plant defense. In *The Mycota V, Part a: Plant Relationships* (Carrol, G.C. y Tudzynski, P., eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 107-128.
- Kombrink, E., y Somssich, I.E. (1995). Defense response of plants to pathogens. In: *Advances in Botanical Research* (Andrews, J.H. y Tommerup, I.C., eds) pp 1-34. Academic Press.
- Kostova, D., Todorov, J., y Christov, St. (1983). Proc. 5th Eucarpia meeting on Capsicum y eggplant. Plovdiv. 154.
- Kubo, S. (1971). Studies on infection and multiplication of tobacco mosaic virus. **Bull. Hatano Tobacco Exp. Station**, 70:1-41.
- Kushad, M.M., y Dumbroff, E.B. (1991). In *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in plants* (Sclum, R.D. y Flores, H.E., eds). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 77-92.

Lamb, C., y Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48:251-275.

Lamaitre, B., Nicolas, J., Michaut, L., Reichhart, J.M., y Hoffman, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in drosophila adults. **Cell** 86:973-983.

Lee, T.M., y Chu, C. (1992). Ethylene induced polyamine accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). coleoptiles. **Plant Physiol.** 100:238-245.

Leslie, C.A., y Romani, R.J. (1988). Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. **Plant Physiol.** 88:833-837.

Leon, J., Lawton, M.A., y Raskin, I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiol.** 108:1673-1678.

Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., y Lamb, C. (1996). Calcium-mediated apoptosis in plant hypersensitive disease resistance response. **Curr. Biol.** 6:427-437.

Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., y Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, 79:583-593.

Linthorst, H.J.M., Meuwissen, R.L.J., Kauffmann, S., y Bol, J.F. (1989). Constitutive expression of pathogenesis related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. **Plant Cell** 1:285-291.

Liu, J.H., Lee-Tam, S.H., y Reid, D.M. (1997). Differential and wound-inducible expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase genes in sunflower seedlings. **Plant Mol. Biol.** 34:923-933.

Logeman, J., Schell, J. y Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. **Analytical Biochemistry** 163: 16-20.

Loi, N.; Osler, R., Snidaro, M.; Ardigo, A., y Lorenzoni, C. (1986). Tolerance to BYDV (barley yellow dwarf virus). in inbreds and hybrids of maize. *Maydica* 31:307-314.

Low, P.S., y Merida, J.R. (1996). The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. **Physiol. Plant** 96:533-542.

- Luis Arteaga, M., y Gil Ortega, R. (1992). Biological characterization of Spanish isolates of tobamovirus. **Capsicum Newsletter**, 11:29-30.
- Lund, S.T., Stall, R.E., y Klee, H. (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. **Plant Cell** 10:371-382.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., y Raskin, I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science**, 250:1002-1004.
- Malcuit, I., Marano, M.R., Kavanagh, T.A., De Jong, W., Forsyth, A., y Baulcome, D.C. (1999). The 25-kDa movement protein of PVX elicits Nb-mediated hypersensitive cell death in potato. **Mol. Plant Microb. Interac.** 12:536-543.
- Martin, S.A.M., Hunter, S.J., Thompson, F.J., y Devaney, E. (1996). Stage specific gene expression in the post-infective L3 of the filarial nematode, *Brugia pahangi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 79:109-112.
- Mathews, R.E.F. (1991). *Plant Virology*, third edition. Academic Press Inc, Syiego. 835 pages.
- McKinney, H.H. (1929). Mosaic diseases in the Canary Isls, West Africa y Gibraltar. **J. Agric. Res.** 39:557-578.
- Medhy, M.C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology** 105:467-472.
- Meshi, T., Motoyoshi, T., Maeda, T., Yoshiwoka, S., Watanabe, H., y Okada, Y. (1989). Mutations in the tobacco mosaic virus 30 kD protein gene overcome *Tm-2* resistance in tomato. **Plant Cell** 1:515-522.
- Messiaen, J., y Van Cutsem, P. 1993. Defense gene transcription in carrot cells treated with oligogalacturonides. **Plant Cell Physiol.** 34:1117-1123.
- Metraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., y Inverdi, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, 250:1004-1005.
- McKinney, H.H. (1952). **Plant Dis. Rep.** 36:184.

- Mindrinos, M., Katagiri, F., Yu, G.L., y Ausubel, F.M. (1994). The *A.thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. **Cell**. 78:1089-1099.
- Mundry, K.W., Schaible, W., Ellwart-Tschürtz, M., Nitsehko, H., y Hapke, C. (1990). Hypersensitivity to tobacco mosaic virus in N'-gene hosts: Which viral genes are involved? Pages 345-359 in: *Recognition and Reponse in Plant-Virus Interactions*. R.S.S. Fraser, ed Springer-Verlag, Heidelberg.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with the tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant** 15:473-497.
- Murphy, T.M., Asard, H., y Cross, A.R. (1998). Possible sources of reactive oxygen during the oxidative burst in plants. In *Plasma membrane redox system and their role in biological stress and disease*. Edited by asardH., Berezi, A., Dordrecht: Kluwer Academic Press 215-246.
- Nakagaki, Y., Hirai, T., y Stahmann, M.A. (1970). Ethylene production by detached leaves with tobacco mosaic virus. **Virology**, 40:1-9.
- Namba, K., Pattanayek, R., y Stubbs, G. (1989). Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus refined structure of tobacco mosaic virus at 2,9Å resolution by X-ray fibre diffraction. **J. Mol. Biol.** 208:307-325.
- Naylor, M. (1998). Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. **Mol. Plant Microb. Interact.** 11:860-868.
- Nibblet, C.L., Dickson, E., Femow, K., Horst, R.K., y Zaitlin, M. (1978). Cross proteccion among four viroids. **Virology**, 91:198-203.
- Nicholson, R.L., y Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 30:369-389.
- Ohshima, M., Itoh, H., Matsuoka, M., Murakami, T., y Ohashi, Y. 1990. Analysis of stress-induced or salicylic acid-induced expression of the pathogenesis-related 1a protein gene in transgenic tobacco. **Plant Cell**. 2, 95-106.
- Otsuki, Y., Shimomura, T., y Takebe, I. (1972). Tobacco mosaic virus multiplication and expression of the N gene in necrotic responding tobacco varieties. **Virology**, 50:45-50.

- Owaga, T., Watanabe, Y., Meshi, T., y Okada, Y. (1991). Transcomplementation of virus-encoded replicase components of tobacco mosaic virus. **Virology** 185:580-584.
- Padget, H.S., Watanabe, Y., y Beachy, R.N. (1997). Identification of the TMV replicase that activates the N gene-mediated hypersensitive response. **Mol. Plant Microb. Interact.** 10:709-715.
- Padget, H.S., y Beachy, R.N. (1993). Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming N gene mediated resistance. **Plant Cell** 5:577-586.
- Paludan, N. (1982). Virus attack in danish cultures of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). specially concerning tobacco mosaic virus. **Acata Hortic.** 127:65-78.
- Pares, R.D. (1985). A tobamovirus infecting *Capsicum* in Australia. **Annu. Appl. Biol.** 106:469-474.
- Pennazio, S., Roggero, P., y Gentile, I. (1985). Effects of salicylate on virus-infected tobacco plants. **Phytopathol. Z** 114:203-213.
- Peña-Cortés, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E.W., y Wilmitzer, L. (1993). Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. **Planta** 191:123-128.
- Pfitzner, U.M. y Pfitzner, A.J. (1992). Expression of a viral avirulence gene in transgenic plants is sufficient to induce the hypersensitive defense reaction. **Mol. Plant. Microb. Interact.** 5, 318-321.
- Pieterse, C.M.J., y van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defense pathways. **Trends Plant Sci.** 4:52-58.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., y van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **Plant Cell** 10:1571-1580.
- Ponz, F., y Bruening, G. (1988). Mechanism of resistance to plant viruses. **Annu. Rev. Phytopathology**, 24:355-381.
- Pritchard, D.W., y Ross, A.F. (1975). The relationship of ethylene to formation of tobacco mosaic virus lesions in hypersensitive responding tobacco leaves with and without induced resistance. **Virology**, 64:295-307.

Quadt, R., y Jaspars, E.M.J. 1989. RNA polymerases of plus-strand RNA viruses of plants. **Molecular Plants Microbe Interactions** 2:219-223.

Rast, A.Th.B. (1988). Pepper tobamovirus and pathotypes in resistance breeding. **Capsicum Newsl.** 7:20-23.

Rast, A.Th.B. (1983). Proc. 5th Eucarpia meeting on Capsicum and eggplant. Plovdiv. 134.

Ross, A.F. (1961a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. **Virology** 14:329-339.

Ross, A.F. (1961b). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. **Virology** 14:340-358.

Ryals, J.A., Neuenschwyer, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., y Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. **Plant Cell** 8:1809-1819.

Ryerson, D.E., y Heath, M.C. (1996). **Plant Cell** 8:393-402.

Saito, T., Yamanaka, K., Watanabe, Y., Takamatsu, N., Meshi, T., and Okada, Y. (1989). Mutational analysis of the coat protein gene of tobacco mosaic virus in relation to hypersensitive response in tobacco plants with the N' gene. **Virology**, 173:11-20.

Saito, T., Meshi, T., y Okada, Y. (1987). Coat protein gene sequences of tobacco mosaic virus encodes host response determinant. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84:6074-6077.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press, New York.

Sargent, T.D. (1987) Isolation of differentially expressed genes. In: Berger SL, Kimmel AR (eds), *Methods in Enzymology*. Volume 152. Guide to Molecular Cloning Techniques, pp. 423-432. Academic Press, San Diego.

Scheel, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. **Current Opinion in Plant Biology**, 1:305-310.

Schmelzer, E., Krüger-Lebus, S., and Hahlbrok, K. (1989). Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves. **Plant Cell** 1:993-1001.

- Schöb, H., Kunz, C., y Meins, F. Jr. (1997) Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: A simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. **Mol. Gen. Genet.** 256:581-585.
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B.G., and Jackson, A.O. (1995) Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from potato virus X vector. **The Plant Cell**, 7:1157-1172.
- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W. and Staskawicz, B.J. (1996). Molecular basis of gene-for gene specificity in bacterial speck disease of tomato. **Science** 274:2063-2065.
- Scolum, R.D., Kaur-Sawhney, R., y Galston, A.W. (1984). The physiology and biochemistry of polyamines in plants. **Arch. Biochem. Biophys.** 235: 283-303.
- Selassie, K.G., Dumas de Vaulx, P., Marchoux, G. y Pochard, E. (1981). Le virus de la mosaïque du tabac chez le piment. I. Apparition en France du pathotype P_{1,2}. **Agronomie** 1:853-858.
- Shah, J., Kachroo, P., y Klessig, D.F. (1999). The *Arabidopsis* *ssi1* mutation restores pathogenesis related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. **Plant Cell** 11:191-206.
- Skaria, M., Lister, R.M., Foster, J.E., y Shaner, G. (1985). Virus content as an index of symptomatic resistance to barley yellow dwarf virus in cereals. **Phytopathology** 79:212-216.
- Smith, C.J. (1996). Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus system. **New Phytol.** 132:1-45.
- Somssich, I.E., (1989). Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley genes. **Plant J.** 8:865-876.
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Kawalleck, P., and Hahlbrock, K. (1988). Gene structure and in situ transcript localization of pathogenesis-related protein 1 parsley. **Mol. Gen. Genet.** 213:93-98.
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollmann, J., and Hahlbrock, K. (1986). Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding pathogenesis-related proteins in cultured parsley cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83:2427-2430.

- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. and Jones, J.D.G. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. **Science** 268:661-667.
- Staskawicz, B.J., Dahlbeck, D., y Keen, N.T. (1984). Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.). **Merr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81:6024-6028.
- Stinzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B. (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie** 75, 687-706.
- Stoimenova, E. (1983). Proc 5th Eucarpia meeting on Capsicum and Eggplant. Plovdiv, 150.
- Strauss, E.C., Kobori, J.A., Siu, G. and Hood, L.E. (1986). Specific-primer-directed DNA sequencing. **Anal. Biochem.** 154:353-360.
- Strauss, J.H., and Strauss, E.G. (1988). Evolution of RNA viruses. **Annual Review of Microbiology** 42:657-683.
- Sulzinski, M.A., y Zaitlin, m. (1982). Tobacco mosaic virus replication in resistant and susceptible plants: in some resistant species virus is confined to a small number of initially infected cells. **Virology** 121:12-19.
- Sutherland, M.W. (1991). The generation of oxygen radicals during host plant response to infection. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 39:79-94.
- Tabor, C.W., y Tabor, H. (1984). Polyamines. **Ann. Rev. Biochem.** 53: 283-303.
- Takahashi, A., Kawasaki, T., Henmi, K., Shii, K., Kodama, O., Satoh, H., y Shimamoto, K. (1999). Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. **Plant Journal** 17:535-545.
- Tang, X.Y., Frederick, R.D., Zhou, J.M., Halterman, D.A., Jia, Y.L. and Martin, G.B. (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of avrPto kinase. **Science** 274: 2060-2063.
- Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M.T. and Díaz-Ruiz, J.R. (1994). Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting L-resistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis. **J. Virol. Meth.** 47:165-174.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., y Collinge, D.B. (1997). Subcellular localization of hydrogen peroxide in plants, hydrogen peroxide accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **Plant J.** 11:1187-1194.

Tiedemann, A.V. (1997). Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 50:151-166.

Tobias, I. Rast, A.T.B., and Maat, D.Z. (1982). Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: Comparative host reactions and serological relationships. **Neth. J. Plant Pathol.** 88:257-268

Tobwin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979). Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76:4350-4354.

Tomero, P., Gadea, J., Conejero, V., and Vera, P. (1997). Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 10, 624-634.

Tostado, J.M. (1995). Estudios de la resistencia y protección mediada por la proteína de la cápsida frente a tobamovirus en plantas de los géneros *Capsicum* y *Nicotiana*. **Memoria Tesis Doctoral**.

Tuner, J.G., y Novacky, A. (1974). The quantitative relationship between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction. **Phytopathology** 64:885-890.

Uknes, S., Winter, A.M., Delaney, T., Vernooij, B., Morse, A., Friedrich, L., Nye, G., Potter, S., Ward, E., y Ryals, J. (1993a). Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. **Mol. Plant Microb. Interact.** 6:692-698.

Uknes, S., Dincher, S., Friedrich, L., Negrotto, D., Williams, S., Thompson-Taylor, H., Potter, S., Ward, E., and Ryals, J. (1993). Regulation of pathogenesis-related protein-1 a gene expression in tobacco. **Plant Cell** 5:159-169.

Ukness, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Potter, S., Slusarenko, A., Ward, E. and Ryals, J. (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 4, 645-656.

- Van Kan, J.A.L., van der Ackerveken, G.F.J.M., de Wit, P.J.G.M. (1991). Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. **Mol. Plant Microbe Interact.** 4:52-59.
- Van Loon, L.C. (1985). Pathogenesis related proteins. **Plant Mol. Biol.** 4:111-116.
- Vera, P., Tomero, P., y Conejero, V. (1993). Cloning and expression of a viroid-induced peroxidase from tomato plants. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 6:790-794.
- Vera, P., Yago, J.H., y Conejero, V. (1988). Immunocytochemical localization of the major "pathogenesis-related" (PR) protein of tomato plants. **Plant Sci.** 55:223-230.
- Vigers, A.J., Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P. (1991). A new family of plant antifungal proteins. **Mol. Plant Microbe Interact.** 4:315-323.
- Wang, H., y Stubbs, G. (1994). Structure determination of cucumber green mottle mosaic virus by X-ray diffraction. **J. Mol. Biol.** 239:371-384.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P., y Ryals, J.A. (1991). Coordinate gene activativity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, 3:1085-1094.
- Weber, H., Schultze, S., and Pfitzner, A.J.P. (1993). Two aminoacid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodaltons movement protein counter the ability to overcome the *Tm2²* resistance gene in tomato. **J. Virol.** 67:6432-6438.
- Wetter, C., y Conti, M. (1988). **ABB Descript Plant Viruses** #330.
- Wetter, C. (1984). Serological identification of four tobamoviruses infecting pepper. **Plant Dis.** 68:597-599.
- Wetter, C., Conti, M., Altschuh, D., Tabillion, R., and van Regenmortel, M.H.V. (1984). Pepper Mild Mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. **Phytopathology** 74:405-410.
- Whetten, R., y Sederof, R. (1995). Lignin biosynthesis. **Plant Cell** 7:1001-1013.
- White, R.F. (1979). Acetyl salicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. **Virology** 99:410-412.

Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P.; Choi, D., Hehl, R., Corr, C., y Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. **Cell** 78:1101-1115.

De Wit, P.J.G.M. (1992). Molecular characterization of gene for gene system in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in the control of plant pathogens. **Ann. Rev. Phytopathol.** 30:391-418.

De Wit, P.J.G.M. (1991). Functional models to explain gene-for-gene relationships in plant pathogen interactions. In: Bolle, T., Meins, F. (eds) *Plant Gene Research*, vol. 8. Genes Involved in Plant Defense. Springer-Verlag, New York.

De Wit, P.J.G.M., Hofman, A.E., Velthuis, G.C.M., y Kuc, J. (1985). Isolation and characterization of an elicitor of necrosis isolated from intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) and tomato. **Plant Physiol.** 71:642-647.

Yamakawa, H., Kamada, H., Satoh, M., y Ohashi, Y. (1998). Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiol.** 118:1213-1222.

Yang, S.F., y Hoffman, N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 35:155-189.

Young, M.J., Forney, J., and Zaitlin, M. (1987). Tobacco mosaic virus replicase and replicative structures. **Journal of Cell Science Supplement** 7:277-285.

Young, M.J., and Zaitlin, M. (1986). An analysis of tobacco mosaic virus replicative structures synthesized *in vitro*. **Plant Molec. Biol.** 6:455-465.

Zaitlin, M., y Hull, R. (1987). Plantvirus-host interactions. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 38:291-315.

Zhu, Q. (1996). Transcriptional activation of plant defense genes. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 6:624-630.

